

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências
ULisboa**



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

Caraterização de bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* ao longo de um gradiente climático no Alentejo

Margarida Isabel Azinhaga Abreu

Mestrado em Biologia dos Recursos Vegetais

Dissertação orientada por:
Doutora Helena Serrano
Professora Doutora Anabela Silva

Agradecimentos

Quero, em primeiro lugar, agradecer às minhas orientadoras: Doutora Helena Serrano e Professora Anabela Silva, por terem aceitado orientar-me e por terem sido incríveis nesta longa jornada!

Obrigada a ambas por tudo o que me ensinaram, por todo o respeito e apoio nas minhas decisões, por toda a paciência e generosidade, e por - mesmo estando longe - não me terem deixado para trás...

À entusiasta Professora Cristina Branquinho, por puxar pelo nosso “brilhozinho nos olhos” e por ter dado o “empurrão” para chegarmos a este tema alentejano.

À Doutora Alice Nunes por toda a ajuda inicial a definir o desenho experimental.

E à restante malta do *eChanges* por fazerem Ciência duma forma profissional, mas descontraída!

À incansável D. Manuela e a toda a malta do laboratório de Fisiologia Vegetal.

À Mafalda que sempre me apoiou no laboratório e sempre se mostrou disponível para me esclarecer dúvidas.

Ao Pedro, ao Eduardo e ao Professor Bernardo.

E à Teresa Rebelo por se mostrar sempre disponível em ajudar por mais aborrecida que fosse a tarefa.

A TODOS os meus colegas do Mestrado em Biologia dos Recursos Vegetais, pelos 2 anos de companheirismo e entreaajuda, e pelas diferenças que nos marcaram e que me fizeram aprender imenso!

Ao João, pela ajuda no campo (a apanhar bolotas docinhasss!), no mapeamento dos pontos de recolha e na análise estatística. Obrigada amigo alentejano!

À Inês, pela ajuda na edição de imagens e em todo um sem fim de auxílio que me foi dando...

À Catarina, pela sua incrível disponibilidade em ajudar o outro, no laboratório ou onde quer que fosse.

Vocês são lindas miúdas! Obrigada por não me terem deixado desistir!

Ao Filipe, por deixar-nos sempre bem-dispostos e por nos manter unidos.

Ao Miguel, por toda a ajuda botânica e por ter incentivado a minha candidatura ao mestrado.

Sem eles a realização deste trabalho não teria sido, de todo, possível.

À minha família impecável.

À minha mãe, por acreditar sempre em mim.

Ao meu pai, por não ter medo de fazer diferente e pela sua enorme paixão pelo campo.

Ao meu irmão que nunca vai ler isto...

Ao meu avô, por se ter disponibilizado de imediato para ir apanhar bolotas para o campo comigo!

Ao meu Afonso plantador de árvores.

Aos meus amigos de longa data e colegas de trabalho do Monte Selvagem por ouvirem todos os meus queixumes ao longo deste longo processo. Obrigada pela paciência malta!

Ao Pedro Nicolau pelas dicas de estatística e gráficos no R.

Ao Engenheiro Alfredo Sendim e ao Montado do Freixo do Meio pela grande inspiração no que à bolota diz respeito.

E por último, mas não menos importante, a todos os inquiridos que provaram as bebidas de bolota do ensaio sobre degustação, e a todos os que se ofereceram para contribuir com bolotas “doces”. Permitiram que conseguisse ligar a sabedoria popular, os interesses do consumidor e a Ciência.

Resumo

Como consequência das alterações climáticas, é esperado um aumento de aridez nas zonas áridas da Bacia do Mediterrâneo. Em Portugal, estas zonas são dominadas por azinheira (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* Lam.), quercínea que, a par com o sobreiro (*Quercus suber* L.), integram o sistema agrosilvopastoril designado de Montado (*Dehesa* em Espanha). Este sistema cobre a maior parte da região sul do país, o Alentejo, e providencia biodiversidade e uma diversidade de serviços de ecossistema. Contudo, nas últimas décadas tem-se vindo a assistir a um declínio do Montado, causado especialmente pelo uso insustentável do solo e agravado pelo aumento da aridez. A perda de indivíduos adultos e a falta de regeneração natural da azinheira suscitam preocupações, uma vez que esta espécie está melhor adaptada às condições mais extremas das zonas áridas. Desta forma, torna-se necessário encontrar estratégias que apoiem a regeneração da azinheira. Parte da solução passa pela sua valorização e dos seus frutos que, sendo nutricionalmente ricos, podem contribuir para uma dieta equilibrada.

Atualmente, as bolotas são utilizadas principalmente para a alimentação dos porcos ibéricos, no entanto, foram usadas como parte da dieta humana durante séculos na Península Ibérica. Hoje em dia, novas receitas são criadas com bolota e esta começa novamente a usar-se como recurso alimentar para consumo humano. As bolotas de azinheira são descritas como as mais doces dentro do género *Quercus* em Portugal. Ainda assim, nem todas as azinheiras produzem bolota naturalmente agradável ao palato. Consta que o povo português designava de “castanholas” as bolotas que eram doces e que apresentavam uma forma mais arredondada. Neste sentido, surgiu a necessidade de compreender como reconhecer azinheiras produtoras de bolota “doce”, tendo em vista a possibilidade de aumentar o interesse no consumo deste fruto e, consequente, de aumentar a valorização da azinheira e do montado onde se insere.

Os principais objetivos deste estudo visam compreender a variabilidade das bolotas no seu conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais ao longo de um gradiente de precipitação, e face a diferenças na sua forma. Isto é, perceber a tendência na perceção de doçura das bolotas num cenário de alterações climáticas.

Foram recolhidas bolotas de cinco indivíduos, ao longo de um gradiente espacial macroclimático de precipitação média anual (30 anos) definido por seis locais de recolha no Alentejo (Portugal), de forma a mimetizar o aumento da aridez, consequência das alterações climáticas previstas para o nosso país. A caracterização das bolotas teve como base parâmetros morfométricos, tais como peso fresco, volume e rácio da forma. Foi também calculado para cada amostra o conteúdo hídrico médio. Os parâmetros bioquímicos determinados foram aqueles que se relacionavam mais com o sabor: os hidratos de carbono não estruturais (o amido, insolúvel, e hidratos de carbono solúveis: D-glucose, D-frutose e sacarose), responsáveis pela doçura; e os fenóis totais como forma indireta de testar o amargor das bolotas.

Concluiu-se que concentrações médias mais elevadas de hidratos de carbono não estruturais, correspondem a locais com níveis de precipitação média anual inferiores. Esta tendência é devida ao decréscimo significativo das concentrações de amido e de hidratos de carbono solúveis, com o aumento da precipitação média anual, e é inversa ao que se determinou para concentrações fenólicas. Deste modo, num cenário em que a aridez se intensifique na zona sul do nosso país, os resultados obtidos sugerem que as bolotas terão maiores concentrações de amido, D-glucose e D-frutose e menores concentrações fenólicas na sua composição e, como tal, serão bolotas mais “doces”. Adicionalmente, concluiu-se que a forma das bolotas apresenta apenas, através do rácio entre o seu comprimento e diâmetro, uma ligeira tendência decrescente com a concentração fenólica total, não apresentando qualquer relação com a composição em hidratos de carbono não estruturais e, portanto, não sendo suficiente para se afirmar que bolotas mais redondas são mais “doces”, como o conhecimento empírico sugere.

Palavras-chave: Aridez; Bolotas; Fenóis; Hidratos de Carbono; Morfometria.

Abstract

As a consequence of climate change, an increase in aridity is expected in the arid areas of the Mediterranean Basin. In Portugal, these areas are dominated by holm oak (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* Lam.), that together with the cork oak (*Quercus suber* L.), integrate the agrosilvopastoral system called *Dehesa* or *Montado*. This system covers most of the southern region of the country, *Alentejo*, and provides biodiversity and a diversity of ecosystem services. However, in the last decades there has been a decline of the *Montado*, specially caused by unsustainable land use and aggravated by the increase in aridity. The lack of natural regeneration of the holm oak raises concern, since this species is better adapted to the extreme conditions of arid areas. Therefore, it is necessary to find strategies that best support the regeneration of the holm oak. Part of the solution lies in the valorisation of this species, specially its fruits which are nutritionally rich, thus contributing to a balanced diet.

Nowadays, acorns are mainly used to feed iberian pigs, however, they have been used as part of the human diet for centuries in the Iberian Peninsula. Currently, new recipes are being created and begin to support acorns as a food resource for human consumption. Holm oak acorns are described as the sweetest within the *Quercus* genus in Portugal. Nonetheless, not all holm oak trees produce acorns that are naturally palate-pleasing and, according to popular belief, the sweetest acorns are the roundest ones, also known as "*castanholas*". Therefore, it is advantageous to understand how to easily recognize which holm oak trees produce "sweet" acorns, to increase the interest in the consumption of this fruit and, consequently, increase the value of holm oak trees and the *Montado*.

The main goals of this study were to understand the variability of the acorn content in non-structural carbohydrates and total phenols, along a precipitation gradient and, additionally, understand the variability of the acorn contents in relation to the acorns' shape. That is, to understand the tendency of the sweetness perception for the acorns, in a scenario of climate change.

Six sampling sites in *Alentejo*, Portugal, were defined along a macroclimatic spatial gradient of average annual precipitation (30 years) to mimic the increase in aridity. From each site, acorns from five trees were collected. The acorns characterization was based on morphometric parameters, such as fresh weight, volume, and shape ratio. The average water content was also calculated for each sample. The biochemical parameters measured were those most related to taste: non-structural carbohydrates (starch, insoluble and soluble carbohydrates: D-glucose, D-fructose and sucrose), responsible for sweetness, and total phenols as an indirect way of testing the acorns bitterness.

It was concluded that higher average concentrations of non-structural carbohydrates correspond to lower average annual precipitation levels. This correlation is the same for starch and soluble carbohydrates concentrations, and is reversed for phenolic concentrations. Therefore, in a scenario of increased aridity, the results obtained suggest an increase in the concentrations of starch, D-glucose and D-fructose and a decrease in the phenolic concentrations, thus, "sweeter" acorns. Additionally, it was concluded that the acorns' shape ratio shows a slight decreasing tendency with the increase in total

phenolics, although not presenting any relation with their composition in non-structural carbohydrates and, therefore, it is not possible to state that rounder acorns are "sweeter".

Keywords: Acorns; Aridity; Carbohydrates; Morphometrics; Phenols.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice	vii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. Alterações climáticas em zonas áridas.....	1
1.2. Montado	2
1.3. A espécie <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i>	2
1.4. A bolota de azinheira	3
1.4.1. Fenologia, formação e produção da bolota	3
1.4.2. Morfologia da bolota.....	4
1.4.3. Composição química da bolota	5
1.4.4. Consumo da bolota.....	7
1.5. Objetivos.....	8
2. Métodos	9
2.1. Área de estudo.....	9
2.2. Seleção e recolha de amostras.....	10
2.3. Caracterização morfométrica	12
2.4. Conteúdo hídrico.....	14
2.5. Parâmetros bioquímicos associados à perceção de doçura	14
2.5.1. Extração e quantificação de hidratos de carbono	14
2.5.1.1. Hidratos de carbono solúveis	14
2.5.1.2. Amido	15
2.5.2. Quantificação dos fenóis totais	15

2.6. Análise dos dados	15
3. Resultados	16
3.1. Características morfométricas das bolotas	16
3.2. Conteúdo hídrico e parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura	21
3.2.1. Influência da precipitação média anual no conteúdo hídrico e em parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura	22
3.2.2. Influência do RF no conteúdo hídrico e em parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura	25
4. Discussão	26
4.1. Variação no conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais das bolotas ao longo de um gradiente de precipitação	26
4.2. Variação no conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais das bolotas face a diferenças na sua forma	28
5. Conclusão	29
5.1. Perspetivas futuras	29
Referências bibliográficas	31
Apêndice I - Tabela Suplementar	I
Apêndice II - Provas de degustação com bebidas de bolota	II
1. Preparação das bebidas de bolota	II
2. Provas de degustação das bebidas de bolota	III

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais constituintes da bolota de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> e respectivos valores médios em percentagem por peso seco (% PS).....	6
Tabela 2 - Localizações dos pontos de amostragem e respetiva precipitação média anual (PMA) entre os anos de 1980 e 2010.	10
Tabela 3 - Métodos testados de armazenamento das bolotas para evitar larvas de coleópteros.	11
Tabela 4 - Intervalos de valores das classes do Rácio da Forma (RF).....	13
Tabela 5 - Média e desvio-padrão do Conteúdo Hídrico (CH) e das concentrações por peso seco (PS) de D-glucose, D frutose, sacarose, amido e fenóis totais, obtidos a partir das amostras compostas de bolotas para cada árvore recolhida.	21
Tabela S1.1 - Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> entre a PMA (azul) e as variáveis biométricas (verde), morfométricas (amarelo) e bioquímicas (vermelho).	I
Tabela S2.1 - Aceitação das bebidas de bolotas de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> e respetivo teor em açúcares solúveis (°Brix).	III
Tabela S2.2 - Perceção de doçura das bebidas de bolotas de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i>	IV

Lista de Figuras

Figura 1 - Carta do Índice de Aridez de Portugal Continental: comparação dos valores médios do trinténio de 1960-1990 com os da década 2000-2010.	1
Figura 2 - Bolotas de azinheira maduras.....	3
Figura 3 - Área de montado amostrada.	9
Figura 4 - Pontos de amostragem ao longo de um gradiente de precipitação média anual entre os anos de 1980 e 2010.	9
Figura 5 - (A) Exemplo de indivíduo amostrado; (B) Exemplo de indivíduo não considerado para o estudo por apresentar sinais de doença nas folhas.	11
Figura 6 - Exemplos de bolotas não consideradas para a caracterização morfométrica. (A) Bolota com furo de coleóptero; (B) Bolota em início de germinação.	12
Figura 7 - (A) Medição do diâmetro da bolota (mm); (B) Medição do comprimento da bolota (mm); (C) Medição do peso fresco da bolota (g); (D) Fotografia de cada amostra.	13
Figura 8 - Peso Fresco (PF) (g), Volume (cm ³) e Rácio da Forma (RF) para as cinco amostras de cada local em estudo.	17
Figura 9 - Rácio da forma médio para cada amostra ao longo do gradiente macroclimático de precipitação média anual.	18
Figura 10 - Representação esquemática com fotografias, das bolotas de cada uma das amostras e respetiva categoria de RF (I, II ou III), ao longo do gradiente macroclimático de precipitação média anual.....	20
Figura 11 - Conteúdo hídrico médio (%) de cada amostra ao longo do aumento da precipitação média anual.....	22
Figura 12 - Concentração de hidratos de carbono não estruturais ao longo do gradiente de precipitação média anual; (A) Concentração total de hidratos de carbono não estruturais, D-glucose + D-frutose + sacarose + amido. (B) Concentração de hidratos de carbono solúveis: D-glucose + D-frutose + sacarose. (C) Concentração de D-glucose. (D) Concentração de D-frutose. (E) Concentração de sacarose. (F) Concentração de amido.	23
Figura 13 - Concentração fenólica ao longo do gradiente de precipitação média anual.....	24

Figura 14 - Concentração fenólica ao longo do aumento do rácio da forma médio.	25
Figura S2.1 - Filtração da suspensão aquosa, bebida, de bolotas de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> . (A) Filtração da bebida pela primeira vez; (B) Sedimento obtido após as três filtrações realizadas na preparação de cada bebida.....	II
Figura S2.2 - Inquérito apresentados aos provadores das bebidas de bolotas de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i>	III

Lista de Abreviaturas

°Brix – Grau Brix

A – Altura

AG – Ácido gálico

CH – Conteúdo hídrico

COMP – Comprimento da bolota

COPA – Área projetada da copa

DAP – Diâmetro à altura do peito

DIAM – Diâmetro da bolota

DNS – Ácido-3,5-dinitrosalicílico

FRU – Concentração de D-frutose

GLU – Concentração de D-glucose

HCl – Ácido Clorídrico

KOH – Hidróxido de Potássio

PF – Peso fresco

PMA – Precipitação média anual

PS – Peso seco

RAS – Razão entre as concentrações dos açúcares solúveis

RF – Rácio Forma

RHC – Razão entre as concentrações dos hidratos de carbono

SAC – Concentração de sacarose

SAS – Soma dos açúcares solúveis

SHC – Soma dos hidratos de carbono

1. Introdução

1.1. Alterações climáticas em zonas áridas

As zonas áridas ocupam cerca de 67% da Bacia do Mediterrâneo (White e Nackoney, 2003) e são classificadas como: hiperáridas, áridas, semi-áridas e subúmidas secas, de acordo com os respetivos valores crescentes do índice de aridez (Barrow, 1992). Em Portugal, as zonas áridas têm vindo a aumentar e encontram-se principalmente na parte sul do país (Figura 1). Caracterizam-se pela disponibilidade reduzida de água devido à baixa precipitação e altas taxas de evaporação (Cherlet *et al.*, 2018), tornando-se altamente suscetíveis à desertificação; isto é, à degradação do solo devido ao seu uso insustentável e a fatores climáticos (Safriel, 2009). A desertificação resulta em perda de solos férteis e de biodiversidade (Reynolds *et al.*, 2007).

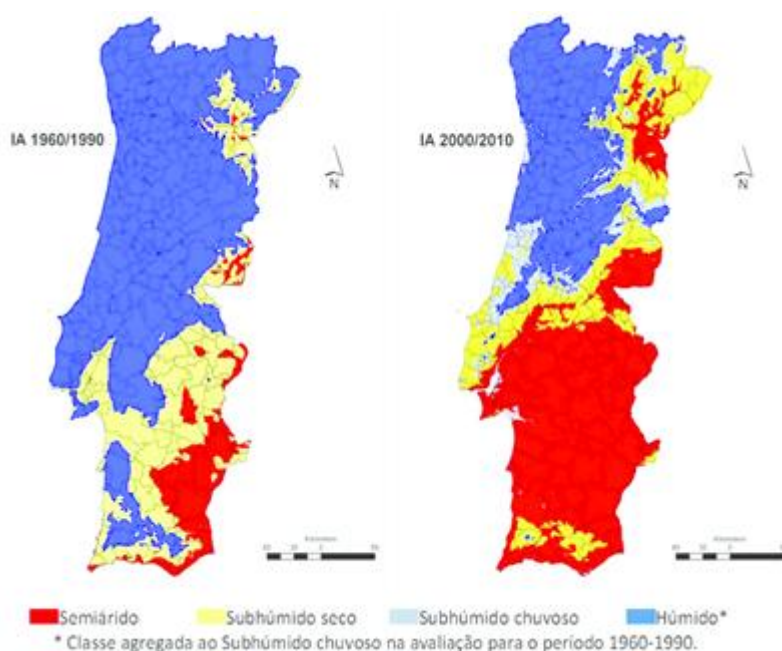


Figura 1 - Carta do Índice de Aridez de Portugal Continental: comparação dos valores médios do trinténio de 1960-1990 com os da década 2000-2010 (Figueiredo *et al.*, 2015).

O clima mediterrânico é caracterizado por verões secos e invernos frios. Contudo, as previsões relativas às alterações climáticas indicam que irá ocorrer um aumento da duração e severidade da seca sazonal de verão (Pinto *et al.*, 2011; Cherlet *et al.*, 2018), com altas intensidades de radiação e altas temperaturas (Oliveira e Peñuelas, 2000; Giorgi e Lionello, 2008), o que levará à escassez de água, principal obstáculo à produtividade da vegetação característica deste clima. Consequentemente, resultará em prováveis mudanças nas faixas de distribuição de algumas espécies de plantas (Benito Garzón *et al.*, 2008). Atualmente, as zonas classificadas como semi-áridas e sub-húmidas secas são, maioritariamente, ocupadas por quercíneas.

1.2. Montado

O Montado, em Portugal (*Dehesa* em Espanha), é um ecossistema florestal semi-natural modelado pelas atividades humanas agro-silvo-pastoris. As árvores presentes encontram-se dispersas, umas em relação às outras, e pertencem essencialmente a espécies de carvalhos como o sobreiro (*Quercus suber* L.) em zonas menos áridas, e a azinheira (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* Lam.) em zonas de maior aridez. O Montado fornece uma diversidade de serviços de ecossistemas, como a conservação e formação do solo, regulação do clima, renovação da água e do ar, sequestro de carbono, polinização e serviços de provisionamento (por exemplo: cortiça ou madeira). É, inclusive, um sistema de extrema importância para a alimentação de gado, particularmente do porco ibérico (Oliveira *et al.*, 2012). Além disso, o Montado também presta serviços como património cultural e identitário, paisagístico e gastronómico (Bugalho *et al.*, 2009; Sá-Sousa, 2014). Assim, os Montados são reconhecidos como sistemas de grande importância tanto por razões socioeconómicas como de conservação da natureza, sendo classificados como terras agrícolas de *Alto Valor Natural* (Cooper *et al.*, 2007), permitindo a agricultura e mantendo uma biodiversidade notavelmente elevada (Godinho *et al.*, 2011).

Porém, para que o Montado mantenha estas características, é necessária uma gestão moderada. Estes sistemas estão agora em declínio, o que significa uma diminuição na densidade das árvores devido à mortalidade de árvores adultas e regeneração natural insuficiente (Benito Garzón *et al.*, 2008; Sá-Sousa, 2014). Isto acontece devido ao abandono em certas áreas e ao uso excessivo em outras (Pinto-Correia *et al.*, 2011), como acontece com o sobrepastoreio (Pinto-Correia, 1993; Bugalho *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2016), bem como devido a eventos climáticos extremos (por exemplo, inundações seguidas de seca) e à presença de agentes patogénicos (Benito Garzón *et al.*, 2008; Corcobado *et al.*, 2013; Pinto-Correia *et al.*, 2013; Corcobado *et al.*, 2014), o que pode aumentar a mortalidade das árvores e impedir a regeneração. O declínio do Montado tem sido relatado desde o final do século XIX no sul de Portugal e aumentou acentuadamente durante a década de 1980 (Godinho *et al.*, 2016; Pinto-Correia e Azeda, 2017).

1.3. A espécie *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*

A espécie *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* Lam. [sinónimos: *Quercus rotundifolia*, *Quercus ilex*, *Quercus ballota*, *Quercus ilex* subsp. *ballota*] (Franco, 1997), vulgarmente designada por azinheira, é uma quercínea de folha persistente (característica da adaptação ao stress hídrico), que está perfeitamente adaptada aos climas temperados característicos da região mediterrânica, ou seja, zonas semiáridas com baixas temperaturas no inverno e altas no verão (Vinha *et al.*, 2016; Bainbridge, 1986). Por ter uma distribuição abrangente (Surová e Pinto-Correia, 2008) e por revelar vantagens em termos de potenciais adaptações a áreas com maior exposição solar (Coelho *et al.*, 2006), a azinheira está descrita como uma espécie a usar em reflorestações em zonas áridas.

Contudo, e apesar da capacidade de preservação de água na planta adulta, a espécie apresenta algumas dificuldades na germinação de novas plântulas em condições de stress hídrico (Salvador *et al.*, 2004). Assim, é expectável que o declínio da azinheira, impulsionado por pragas e agentes patogénicos, será agravado por cenários de aumento da aridez (Costa *et al.*, 2008; Corcobado *et al.*, 2013; Godinho *et al.*, 2016). Além disso, à escala local, as condições do microclima gerado pela topografia, podem afetar significativamente a regeneração natural da azinheira ao longo do tempo (Príncipe *et al.*, 2014). Por estas razões é necessário estudar com mais detalhe os insucessos das germinações de azinheira para que se possa rentabilizar a espécie ecologicamente. Para valorização da espécie, e ao contrário do que acontece com o sobreiro, em que o principal interesse económico é a cortiça, na azinheira o maior interesse económico é a bolota (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006).

1.4. A bolota de azinheira

1.4.1. Fenologia, formação e produção da bolota

À semelhança das outras espécies do género *Quercus*, o fruto da azinheira é a bolota ou glande. As bolotas só começam a ser produzidas quando a árvore atinge os 15-20 anos de idade (Natividade, 1950). Este é um fruto que possui apenas uma semente que não abre, um aquénio, indeiscente e monospérmico. As bolotas são constituídas pelo pericarpo (casca) que é a capa externa lignificada que protege a semente; pela cutícula ou pele que se encontra junta ao endosperma e apresenta sabor adstringente; e são rodeadas parcialmente por um invólucro calciforme, a cúpula. Por sua vez a semente é composta pela testa, uma espécie de membrana aveludada, e pelo embrião (Watson e Dallwitz, 1991). O embrião é constituído por dois cotilédones que incluem o endosperma onde se acumulam as reservas energéticas (Ramos, 2002).



Figura 2 - Bolotas de azinheira maduras.

A azinheira apresenta um ciclo reprodutivo anual, ou seja, basta uma temporada para completar o seu ciclo de reprodução e obter frutos. Sendo uma espécie monóica, possui os dois sexos independentes no mesmo indivíduo, isto é, produz flores masculinas (amentilhos) e flores femininas. A floração ocorre entre os meses de abril e maio, enquanto as reservas hídricas estão mais abundantes no solo. Depois de uma polinização anemófila, segue-se a formação das bolotas, que se desenvolvem ao longo do verão, amadurecendo no outono. Estas começam a cair da árvore entre outubro e novembro e, por vezes, ainda em dezembro; no entanto, o fruto já maduro pode manter-se aderente à árvore durante mais algum tempo. A semente no seu interior perde rapidamente a capacidade germinativa por oxidação dos ácidos gordos (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). Além disso, quando começam a cair da árvore, sofrem consideráveis perdas antes da dispersão, por parte de insetos perfuradores (ex.: *Curculio* sp.).

Carevic *et al.* (2009) sugere que as condições climáticas e a disponibilidade de recursos no solo têm bastante influência no estado hídrico da árvore e, conseqüentemente, no desenvolvimento das bolotas de azinheira ao longo do verão. A produção de bolota está correlacionada com a precipitação anual, primaveril e outonal (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006). Segundo Rodríguez-Estévez *et al.* (2007), a produção de bolota depende ainda do estado sanitário da árvore, da manutenção que poderá ter ocorrido na árvore (ex. podas), da densidade da própria árvore e das suas características genéticas. Ainda que a produção de bolota seja muito irregular ao longo dos anos pelas razões referidas anteriormente, sabe-se que o montado de azinho é mais produtivo que o montado de sobre em relação à bolota. Autores de estudos conduzidos em Espanha indicam que a produção anual varia entre 7-26 kg por árvore ou, segundo outros autores, entre 475-674 kg/ha (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006).

1.4.2. Morfologia da bolota

As bolotas podem apresentar morfologias diferentes de árvore para árvore, exibindo uma grande variabilidade no tamanho, peso e forma, inclusive entre indivíduos da mesma espécie e na mesma área geográfica. Os comprimentos e diâmetros das bolotas de azinheira variam de 31,9 a 38,1 mm e de 13,9 a 16,6, respetivamente, e os seus pesos frescos vão de 3,4 a 6,9 g; sendo que o tamanho e o peso das bolotas dentro de um mesmo indivíduo permanecem constantes ao longo dos anos (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008; Castro, 2009). Todavia, alguns estudos indicam que a ocorrência de variações nas condições edafoclimáticas provoca não só alteração no número de sementes produzidas anualmente, como também alteração nos seus tamanhos (Galván *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2005; Oliveira, 2014). Por outro lado, Fernandez *et al.* (2005) assinala a duração do período vegetativo como principal causa na variação do tamanho das bolotas em cada árvore, sendo que bolotas maiores resultam de adiantamentos na brotação e floração.

O tamanho da semente é bastante relevante ecologicamente, tanto para a propagação da espécie, quanto para o estabelecimento da planta em determinada área (Koenig *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2005) e, nesse sentido, foram encontradas diferenças no crescimento e fisiologia das plântulas que se

correlacionavam com diferenças no volume e peso das respectivas bolotas (Bonito *et al.*, 2011; Long e Jones, 1996).

Foi verificado por Oliveira (2014) que bolotas maiores correspondiam a locais com maiores níveis de aridez e, ainda, que o tamanho das bolotas está relacionado negativamente com o conteúdo em hidratos de carbono solúveis. Numa outra perspetiva, Rodríguez-Estévez *et al.*, (2009) sugeriu que os porcos ibéricos possam ter preferência por bolotas maiores, não consumindo bolotas pequenas no início da “montanha”.

1.4.3. Composição química da bolota

De um ponto de vista geral, as bolotas de *Quercus* sp. são bastante ricas em hidratos de carbono. Estes constituem a principal forma de reserva energética das sementes (Fernández *et al.*, 2005), onde é possível encontrar paredes celulares hipertrofiadas, que resultam em locais de armazenamento extra de hidratos de carbono, usados durante o processo de germinação (Périsse, 2002). O amido, insolúvel em água, pode assumir cerca de 60% da matéria seca total de uma bolota. Além disso, podem também ser encontrados nas bolotas hidratos de carbono solúveis, tais como D-glucose e sacarose, variando entre os 4,7 e os 11,2% da matéria seca total (Fernández *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 1992).

O armazenamento de lípidos enquanto reserva energética não é tão comum, contudo no seu perfil lipídico estão incluído sobretudo ácidos gordos como o oleico, o palmítico e o linoleico (Tejerina *et al.*, 2011; Gea-Izquierdo *et al.*, 2006; Cantos *et al.*, 2003).

Em relação ao seu conteúdo proteico, as bolotas apresentam baixo teor de proteínas na sua constituição, apresentando valores de cerca de 5% em matéria seca (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008), podendo variar entre 3,6 e 10,5%, conforme a espécie (Fernández *et al.*, 2005).

Possuem também fibras e vitaminas, como a A e a E (Vinha *et al.*, 2016), e são ainda ricas noutros compostos com efeitos antioxidantes (Rakic *et al.*, 2006), tais como polifenóis, onde se incluem os taninos, responsáveis pela adstringência e amargor característicos do fruto (Oliveira *et al.*, 2012). Segundo Cantos *et al.* (2003), na cutícula são também encontrados elevados níveis de polifenóis com função de proteger a semente de ataques externos. A composição da casca tem um teor elevado de taninos e lenhina, o que afeta a sua digestibilidade (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). São ainda descritos minerais como Fe, Cu, Zn, Mn, Ca, Mg, P e K na sua constituição (Rakić *et al.*, 2006), importantes micro e macronutrientes e cofatores enzimáticos no metabolismo do fruto (Gea-Izquierdo *et al.*, 2006). No caso da azinheira em particular, a Tabela 1 mostra a composição química dos seus principais constituintes.

Tabela 1 - Principais constituintes da bolota de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* e respetivos valores médios em percentagem por peso seco (% PS); adaptado de Oliveira *et al.* (2012) e Passarinho *et al.* (2019).

Composição química	Conteúdo (% PF)
Amido	30,80
Lípidos	6,40
Proteínas	2,26
Fenóis Totais	3,97
Taninos	3,81

Quando comparados estes valores de bolotas de azinheira (Tabela 1) com valores relativos a bolotas de sobreiro, verifica-se que as bolotas de azinheira apresentam menor teor proteico (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008), cerca de metade da concentração de fenóis totais e de taninos e maiores concentrações de hidratos de carbono e lípidos, tal como comprovado por Oliveira *et al.* (2012). Estes resultados estão de acordo com a distribuição geográfica das respetivas espécies, uma vez que é conhecido que lípidos e hidratos de carbono retêm água e protegem as sementes da dessecação e das baixas temperaturas. Adicionalmente, estes resultados, que mostram maiores concentrações de “açúcares” (hidratos de carbono) e menores em taninos nas bolotas de azinheira, vão influenciar a maior perceção de doçura nestas bolotas.

Acresce que, em estudos conduzidos por Rahbi *et al.* (2016), quando comparadas bolotas de azinheira com bolotas de outras espécies de *Quercus* sp., revelaram maiores concentrações de γ -tocoferol, evidenciando a possibilidade de utilização da espécie como potencial fonte de biomoléculas (com efeito antioxidante) para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

A composição química, à semelhança do que acontece com a morfologia da bolota, depende de aspetos genéticos e fisiológicos relacionados com a planta e de fatores externos, como a composição do solo e os microrganismos envolventes, condições climáticas e a origem geográfica (Cañelas *et al.*, 2003). Quando falamos de aspetos fisiológicos, a maturação e, por consequência, a data da queda do fruto, são dos principais fatores que interferem com a composição química dos mesmos (Tejerina *et al.*, 2011; Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008).

Do início ao fim do ciclo de amadurecimento do fruto, foram detetadas diferenças significativas na composição química das bolotas; observando-se um aumento no teor de hidratos de carbono e lípidos e uma diminuição no teor de taninos e, portanto, uma melhoria no valor nutricional e sensorial do fruto (Oliveira *et al.*, 2012; Lopez-Carrasco *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 1992). Neste sentido, a bolota é um elemento dinâmico deste sistema agroflorestral, com aspetos variáveis no seu conteúdo em reservas energéticas e na sua composição antioxidante, ao longo dos meses do outono e inverno e entre anos diferentes (Tejerina *et al.*, 2011).

1.4.4. Consumo da bolota

A bolota é um alimento nutricionalmente rico que pode contribuir para uma dieta equilibrada quando consumido regularmente e em conjunto com outros alimentos (Vinha *et al.*, 2016; Ozcan, 2016; Silva *et al.*, 2016), ou enquanto nutracêutico (Bainbridge, 2001; Rtibi *et al.*, 2017). Além disso, é também um importante produto do montado e, portanto, explorar as suas potencialidades na alimentação humana é uma forma de valorizar a flora autóctone e o seu potencial económico na Península Ibérica.

Apesar de atualmente serem utilizadas principalmente para a alimentação dos porcos ibéricos, as bolotas foram usadas como parte da dieta humana durante séculos (Fonseca, 2015; García-Gómez *et al.*, 2017). São vários os registos da Idade Média que nos remetem para a bolota de azinheira como base na alimentação humana nesta região do mundo, antes até da utilização do milho e da batata (García-Gómez *et al.*, 2017; Rakić *et al.*, 2007; Bainbridge, 2001). A referência na literatura mais antiga sobre o assunto pertence a Hesíodo, grego do século VII a.C., na sua obra “Os Trabalhos e os Dias”: “*A Terra produz bastante sustento... A azinheira está carregada de abundantes bolotas nos seus ramos mais altos...*” (Hesíodo, 1978). Seguindo-se Estrabão uns séculos mais tarde, historiador romano, que se refere à bolota de azinheira como base alimentar do povo Lusitano; considerada o alimento dos homens invencíveis (Amorim, 1987).

Dado que a frutificação da espécie, à semelhança do que acontece nas restantes espécies de *Quercus*, ocorre no período outono-invernal, época do ano em que escasseiam os frutos e vegetais, as bolotas constituíam um alimento muito abundante que os povos primitivos aprenderam a consumir. A elevada abundância e distribuição homogênea das espécies de árvores de *Quercus* permitiram que o consumo da bolota se generalizasse em toda a Península Ibérica. Tal como aconteceu durante a 2ª Guerra Mundial em que recorreram às bolotas durante o racionamento de cereais. Mas o paradigma mudou na década de 60 e o seu consumo diminuiu devido à melhoria progressiva das condições de vida da população rural com a modernização pós-guerra (Fonseca, 2015; Sottomayor, 2015).

Durante o longo período de consumo de bolota para alimentação humana, as bolotas de azinheira sempre foram as preferidas, uma vez que eram consideradas mais doces e naturalmente mais agradáveis ao paladar, sem que fossem necessários tratamentos posteriores à colheita para lhes retirar o amargor dos taninos (dado que o seu teor em taninos e fenóis totais é inferior, deixando sobressair o sabor dos açúcares presentes) (García-Gómez *et al.*, 2017), apesar de outras também serem utilizadas (Matos, 2011). O consumo de bolotas amargas foi possível através de práticas de preparação ou de armazenamento que foram surgindo ao longo do tempo. O descasque e a lavagem das bolotas permitem a perda do sabor amargo, e a torrefação confere-lhes um sabor diferente (Sálková *et al.*, 2011).

Estudos realizados com porcos ibéricos demonstraram que estes também preferem primeiramente bolotas de azinheira se tiverem opção de escolha, resultados que podem ser justificados

pelas maiores concentrações de amido e lípidos nas bolotas desta espécie (Oliveira *et al.*, 2012). A composição da semente de azinheira produzida nos montados portugueses é similar à reportada por Gea-Izquierdo *et al.* (2006) nos montados espanhóis. Ainda assim, nem todas as azinheiras produzem bolota naturalmente agradável ao palato e consta que o povo português designava de “castanholas” as bolotas que eram doces, que apresentavam uma forma mais arredondada e se assemelhavam mais a castanhas em sabor, e de “bical” curta ou longa às bolotas mais pontiagudas (Fonseca, 2015).

1.5. Objetivos

Este trabalho surgiu da necessidade de compreender como reconhecer azinheiras produtoras de bolota “doce”, tendo em vista a possibilidade de aumentar o interesse no consumo deste fruto e, consequente, de aumentar a valorização da azinheira e do montado onde se insere. Neste sentido, os principais objetivos deste trabalho são:

- 1) compreender a variabilidade das bolotas no seu conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais, ao longo de um gradiente de precipitação, tendo como base a hipótese de que bolotas de azinheiras de locais mais áridos são mais doces;
- 2) compreender a variabilidade das bolotas no seu conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais, face a diferenças na sua forma, baseado na hipótese de que bolotas com formas mais arredondadas são mais doces.

De um modo geral, este estudo pretende perceber a tendência na perceção de doçura das bolotas em relação à sua morfologia e às condições climáticas ideais em que estas se encontram. Também, considerando o expectável aumento da aridez no nosso país como consequência das alterações climáticas, aumentar o número de dados que apoiem a integração de bolotas de azinheira na alimentação humana.

2. Métodos

2.1. Área de estudo

O estudo realizou-se em área de montado (Figura 3), na região do Alentejo, em Portugal. Esta região é caracterizada pelo clima temperado, apresentando verões secos e quentes, e invernos chuvosos com temperaturas moderadas a frias (Rivas-Martínez *et al.*, 2004). A precipitação média anual (PMA) entre os anos de 1980 e 2010 na área de estudo variou de 529 mm a 685 mm (Hijmans *et al.*, 2005).



Figura 3 - Área de montado amostrada.

Estes valores de PMA foram utilizados como indicadores da aridez para selecionar os diferentes locais de recolha de amostras. Foram selecionadas seis diferentes áreas de amostragem ao longo de um gradiente macroclimático (Tabela 2 e Figura 4).

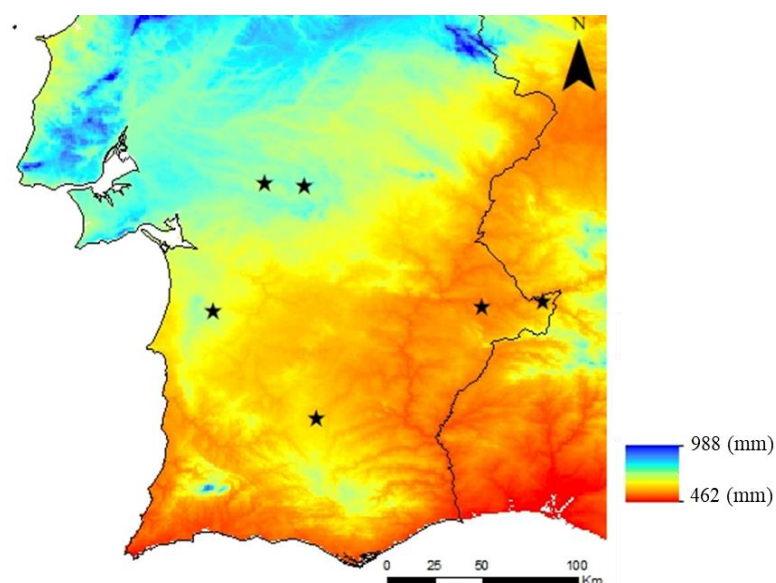


Figura 4 - Pontos de amostragem ao longo de um gradiente climático. A escala de cores representa a precipitação média anual entre os anos de 1980 e 2010.

Tabela 2 - Localizações dos pontos de amostragem e respetiva precipitação média anual (PMA) entre os anos de 1980 e 2010.

Localização	PMA (mm)
Moura	529,00
Herdade da Coitadinha, Barrancos	549,00
Rosário, Almodôvar	581,40
Grândola	629,80
Herdade do Freixo do Meio, Foros de Vale Figueira	677,50
Montemor-o-Novo	685,00

2.2. Seleção e recolha de amostras

Para cada um dos seis locais selecionados (Tabela 2) foram coletadas cerca de 100 bolotas de cinco árvores adultas, nunca ultrapassando 10km² de área entre indivíduos. As bolotas foram recolhidas do solo, para diminuir a probabilidade de recolha de bolotas imaturas, na área correspondente à área ocupada pela copa da árvore.

A seleção dos cinco indivíduos em cada local baseou-se, primeiramente, na escolha de áreas que não apresentassem declive acentuado do solo. De seguida, nos respetivos diâmetros do tronco à altura do peito (DAP) e no seu aspeto morfológico (Figura 5.A), excluindo árvores que mostrassem sinais de doença nas ramificações ou folhas (Figura 5.B) e árvores que não apresentassem, no mínimo, 40 cm de diâmetro à altura do peito.

Assim, para cada árvore amostrada foi medido o perímetro à altura do peito (ca. 1,35 m) e, posteriormente, calculado o diâmetro do tronco a essa mesma altura. Adicionalmente, foram também medidos os diâmetros perpendiculares (Norte-Sul e Este-Oeste) da copa de cada indivíduo. A altura das árvores foi estimada utilizando um hipsómetro (Forestry Pro, Nikon, Japão). A área da copa foi calculada usando a aproximação de uma elipsoide, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1: Área da copa} = \pi \times \left(\frac{\text{Diâmetro Norte-Sul}}{2} \right) \times \left(\frac{\text{Diâmetro Este-Oeste}}{2} \right)$$

Foram realizados dois períodos de amostragem, utilizando para ambos o mesmo desenho experimental e a mesma metodologia. A primeira colheita realizou-se em novembro de 2018 e a segunda colheita em janeiro de 2019. Em ambas as situações, as bolotas foram guardadas em sacos de papel e levadas para o laboratório.

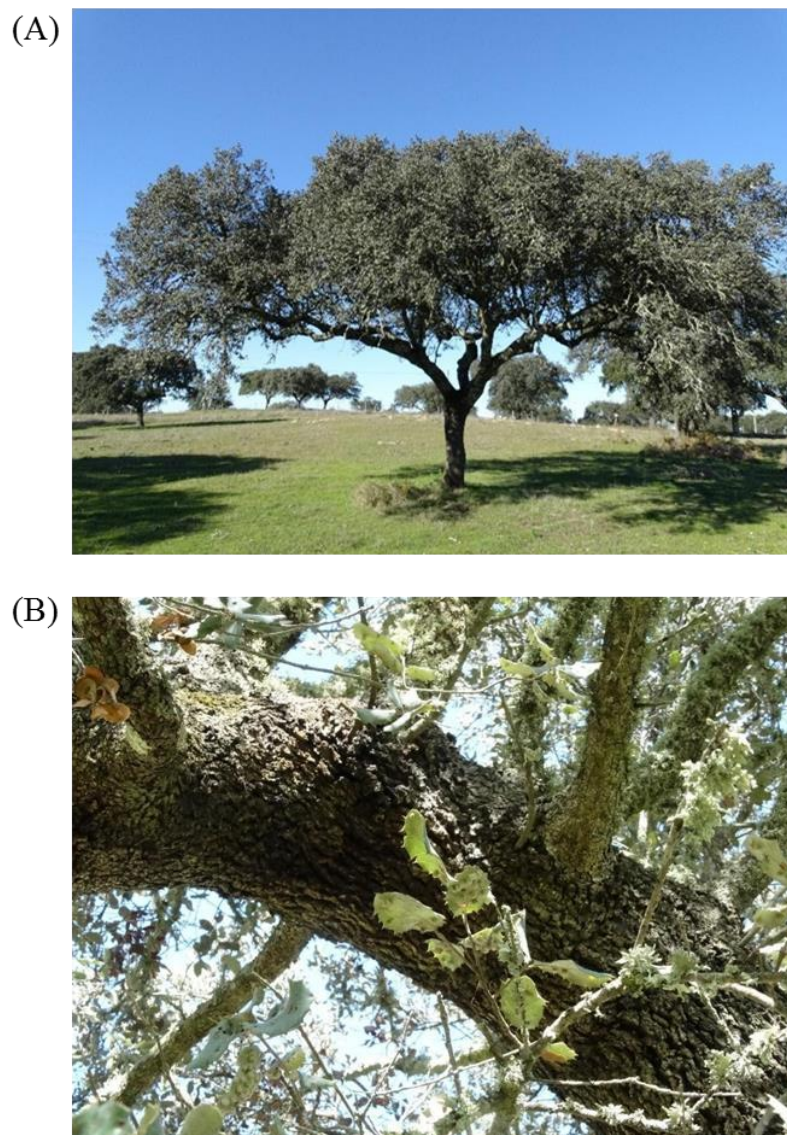


Figura 5 - (A) Exemplo de indivíduo amostrado; (B) Exemplo de indivíduo não considerado para o estudo por apresentar sinais de doença nas folhas.

Dado o reduzido aproveitamento das bolotas colhidas na primeira colheita, por estarem infestadas com larvas de coleópteros (*Curculio* sp.), foram testados quatro métodos diferentes de armazenar as bolotas da segunda colheita.

Tabela 3 - Métodos testados de armazenamento das bolotas para evitar larvas de coleópteros.

	Método testado
1	Temperatura e humidade ambiente
2	4°C com sílica
3	4°C sem sílica
4	-80°C com gelo seco

Deste teste, avaliaram-se, ao fim de 30 dias, o conteúdo hídrico e o número de bolotas com furo de coleópteros, tendo-se concluído que os métodos 3 e 4 permitiam armazenar as bolotas de forma a efetuar as análises bioquímicas sem alterações significativas e sem desenvolvimento de larvas.

2.3. Caracterização morfométrica

Para caracterizar cada uma das amostras recolhidas foram selecionadas 15 bolotas de maior calibre, isto é, bolotas com maior volume; com aspeto apelativo, numa perspetiva comercial e sem sinais de infeção ou doença; excluindo também bolotas que apresentassem ainda cor verde, indicando não estarem num estado final de maturação; e excluindo bolotas que já apresentassem sinais de germinação (Figura 6).

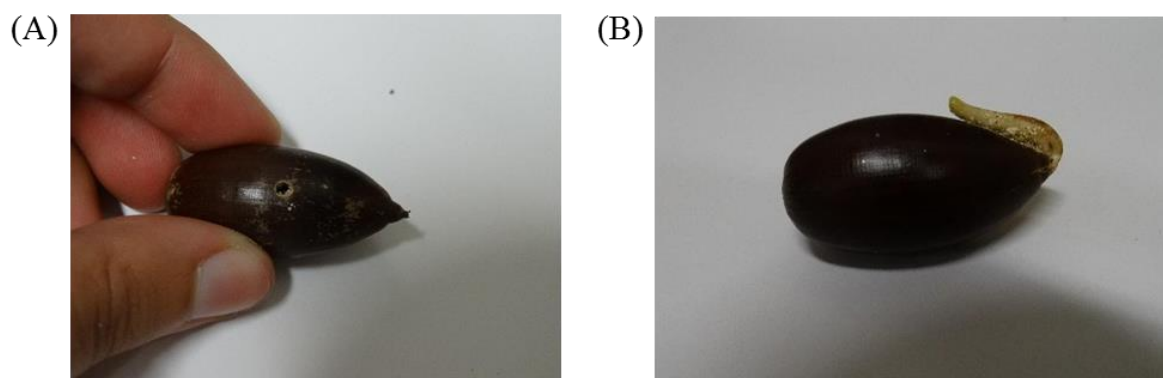


Figura 6 - Exemplos de bolotas não consideradas para a caracterização morfométrica. (A) Bolota com furo de coleóptero; (B) Bolota em início de germinação.

Depois de separadas das restantes, foram realizadas medições individuais a cada uma das 15 bolotas quanto ao seu peso (Figura 8.C; balança Sartorius, BP 3100 S), diâmetro (Figura 8.A) e comprimento (Figura 8.B), com o auxílio de uma craveira eletrónica (Mitutoyo, Digimatic Caliper), para que, além do seu peso fresco (PF), fosse possível obter-se informação em relação à sua forma e volume. O volume de cada bolota foi calculado considerando aproximação a uma elipsóide, como consta na Equação 2:

$$\text{Equação 2: Volume da bolota} = \frac{4}{3}\pi \times \left(\frac{\text{Comprimento}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{Diâmetro}}{2}\right)^2$$

Em relação à sua forma, foi calculada a razão (rácio forma, RF) entre o comprimento e o diâmetro de cada bolota, de acordo com a Equação 3:

$$\text{Equação 3: RF} = \frac{\text{Comprimento}}{\text{Diâmetro}}$$

Sabendo que a forma da bolota se assemelha a uma elipsóide, o seu rácio não será unitário, uma vez que o comprimento nunca será igual ao diâmetro.

Tabela 4 - Intervalos de valores das classes do Rácio da Forma (RF).

Classe	Intervalo de valores da classe
I	1,8 – 2,29
II	2,3 – 2,78
III	2,79 – 3,26

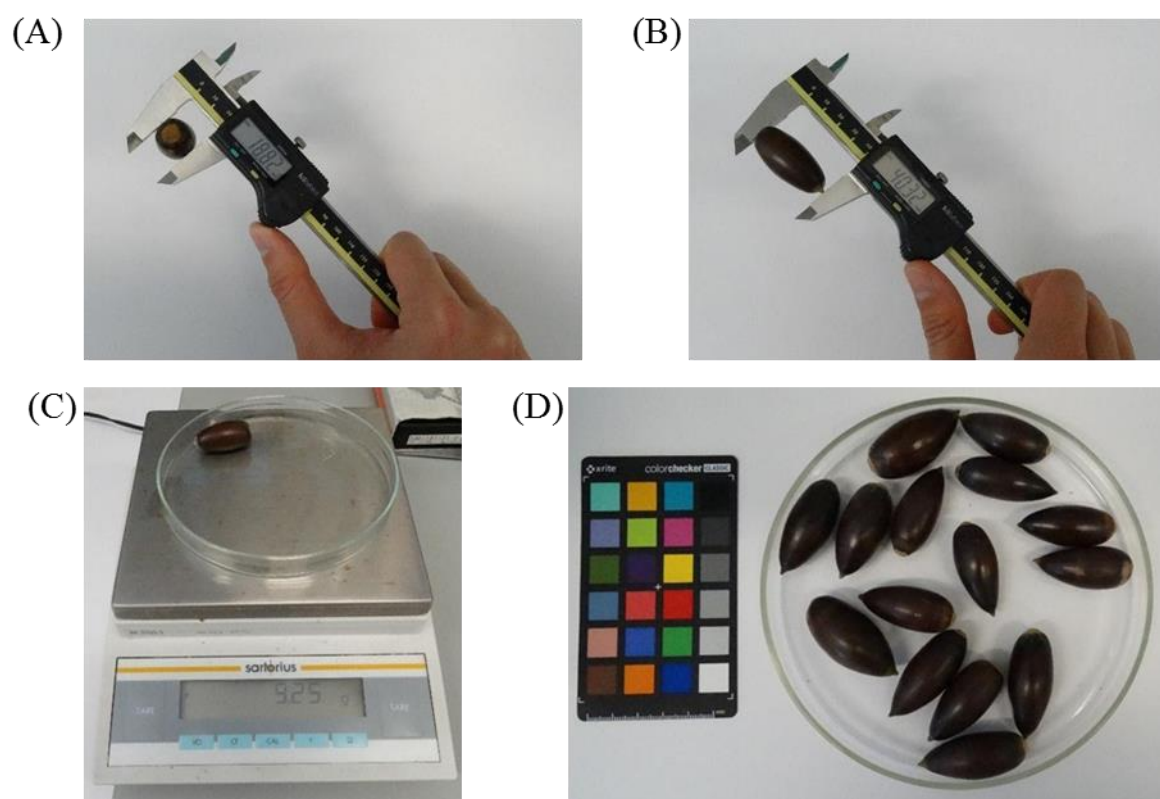


Figura 7 - (A) Medição do diâmetro da bolota (mm); (B) Medição do comprimento da bolota (mm); (C) Medição do peso fresco da bolota (g); (D) Fotografia a cada amostra com as 15 bolotas selecionadas e recurso ao cartão de cores.

Foram tiradas fotografias às 15 bolotas selecionadas de cada amostra, usando um cartão de cores (Color Checker Classic, X-Rite) (Figura 8.D) para posterior correção de cor com o quadrado branco no programa ImageJ 1.53c.

2.4. Conteúdo hídrico

As amostras foram colocadas a secar a 70°C, até estabilizar o peso, e foi determinado o seu peso seco (PS) médio. O conteúdo hídrico (CH) médio das amostras foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$\text{Equação 4: CH (\%)} = \left(\frac{PF - PS}{PF} \right) \times 100$$

2.5. Parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura

Para esta caracterização utilizaram-se apenas as amostras da segunda colheita, recolhidas em janeiro de 2019. Uma vez que a produção do fruto ocorre entre os meses de outubro e fevereiro, estas bolotas apresentavam estágios de maturação superiores.

Para a realização dos ensaios bioquímicos, foram preparadas amostras compostas, correspondentes a cada um dos indivíduos amostrados dos seis diferentes locais (30 amostras). Selecionaram-se aleatoriamente oito bolotas das 15 caracterizadas anteriormente (descrito em 2.3) e, usando um moinho de café, foram transformadas em farinha. Após 48 horas na estufa a 70°C, para evitar a contaminação por fungos, as amostras compostas, foram guardadas num local seco e à temperatura ambiente.

2.5.1. Extração e quantificação de hidratos de carbono

A extração dos hidratos de carbono das bolotas realizou-se a partir de 50 a 70 mg de peso seco, de cada uma das amostras compostas, com 2 mL de etanol a 80% (v/v), a 80°C durante 5 min., arrefecidos posteriormente em gelo e centrifugados a 16000 G x 2 min. (Bernardes da Silva *et al.*, 2018). O sobrenadante foi utilizado na determinação dos hidratos de carbono solúveis - sacarose, D-glucose e D-frutose, enquanto que a fração insolúvel foi usada na quantificação do amido.

2.5.1.1. Hidratos de carbono solúveis

Os sobrenadantes resultantes foram evaporados na estufa a 70°C, durante 48h, e o resíduo de cada amostra ressuspenso em 1 mL de água ultra-pura.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria, em leitor de microplacas (Bio Tek Modelo Epoch2, BioTek Instruments, USA), e ocorreu por métodos enzimáticos através de kits de doseamento de sacarose/ D-glucose/ D-frutose (NZYtech, Lda, Portugal), tal como indicado no protocolo dos fabricantes (Sebastiana *et al.*, 2016).

2.5.1.2. Amido

A fração insolúvel resultante da centrifugação descrita no tópico 2.5.1 foi usada para a determinação do conteúdo em amido. Após secagem a 70°C durante 48h, trituraram-se as amostras e adicionaram-se 250 µL de HCl a 30 % (v/v), agitando a mistura no vortex. De seguida, para promover a hidrólise ácida do amido, colocaram-se as amostras a 90°C durante 10 min., em banho quente a seco, e, após esse tempo, arrefeceram-se rapidamente em gelo; adicionou-se, por fim, 500 µL de KOH 5N para aumentar o pH da amostra de modo a não interferir com o subsequente doseamento. Para retirar impurezas existentes, a amostra foi filtrada com filtros de 0,45 µm de poro (Dinistrat Filter RC 25, Sartorius).

Para a quantificação do amido, a 10 µL de amostra filtrada, juntaram-se 90 µL de água ultra-pura e 0,9 mL do reagente de DNS (Ácido-3,5-dinitrosalicílico). De seguida, aqueceu-se a solução a 100°C durante 3 min. e arrefeceu-se em gelo rapidamente até que esta voltasse à temperatura ambiente (Arrabaça, 1981). Foram medidas as absorvâncias a 490 nm num leitor de microplacas (Bio Tek Modelo Epoch2, BioTek Instruments, USA). A concentração de amido das amostras foi calculada por comparação com a curva de concentrações conhecidas de D-glucose e expressa em mg g⁻¹ PS.

2.5.2. Quantificação dos fenóis totais

Para a quantificação dos fenóis totais, adaptou-se o método descrito por Duarte *et al.* (2013). Primeiramente, procedeu-se à maceração mecânica de cerca de 15 mg de cada amostra composta com areia de quartzo (10 a 20 mg) cerca de 30 segundos. Depois, maceraram-se as amostras em metanol na proporção de 1:100 (m/v) e promoveu-se a extração durante 1h. Centrifugaram-se as amostras durante 1 min. a 16000G. A 400 µL do sobrenadante, adicionaram-se 2 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído (1:10 v/v), e posteriormente 1,6 mL de Na₂CO₃ 7,5% (m/v).

Após uma hora de incubação no escuro e à temperatura ambiente, foram medidas as absorvâncias a 760 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio Tek Modelo Epoch2, BioTek Instruments, USA). A concentração de fenóis totais foi calculada através de comparação com a curva de concentrações de ácido gálico e expressa em miliequivalentes de Ácido Gálico (meqAG) g⁻¹ PS.

2.6. Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada no Microsoft Excel 2016 para médias e respetivos desvios padrão. A restante análise estatística foi realizada no *software* RStudio versão 3.6.1. Para avaliar a Normalidade e a Homocedasticidade dos dados em estudo, foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respetivamente. Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* para testar diferenças significativas entre amostras para os diferentes parâmetros morfométricos e bioquímicos, seguido por testes de Dunn para verificar quais as diferenças significativas quando detetadas. Salvo indicação em contrário, todos

os testes foram executados com um nível de significância de $p < 0,05$. De seguida, e através de análise gráfica, foi estudada a significância das correlações entre os dados obtidos e as variáveis em estudo, utilizando uma tabela de correlação de Spearman. Foram construídos modelos lineares generalizados para testar o efeito da precipitação média anual e o efeito da sua forma na composição bioquímica das amostras.

Salvo indicação em contrário, todas as fotografias presentes foram tiradas pelo autor da tese.

3. Resultados

3.1. Características morfométricas das bolotas

A caracterização morfométrica das bolotas de cada uma das azinheiras amostradas teve como base a análise dos respetivos pesos frescos, volumes e rácios da forma, tal como mostra a Figura 8, em que os respetivos valores estão divididos consoante o local onde foram recolhidas as bolotas.

Dentro de cada local estudado não foram encontradas diferenças significativas entre as bolotas das cinco árvores amostradas para peso fresco, volume e rácio das mesmas, segundo o teste *Kruskal-Wallis* para $p < 0,05$; à exceção das diferenças indicadas nos gráficos.

Relativamente à variação entre diferentes locais, foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros do peso fresco e do volume, utilizando o teste *Kruskal-Wallis* para $p < 0,05$. No peso fresco, foram encontradas diferenças entre amostras recolhidas em Moura (529 mm) e no Rosário (581,40 mm) e também entre amostras do Rosário e da Herdade da Coitadinha (549 mm). Além disso, foram também encontradas diferenças entre as amostras de Montemor-o-Novo e de Moura e de Montemor-o-Novo e da Herdade da Coitadinha. Para o volume, as diferenças significativas observam-se entre amostras de Grândola e do Rosário e entre as de Moura e as da Herdade da Coitadinha, Rosário e Montemor-o-Novo (Figura 8).

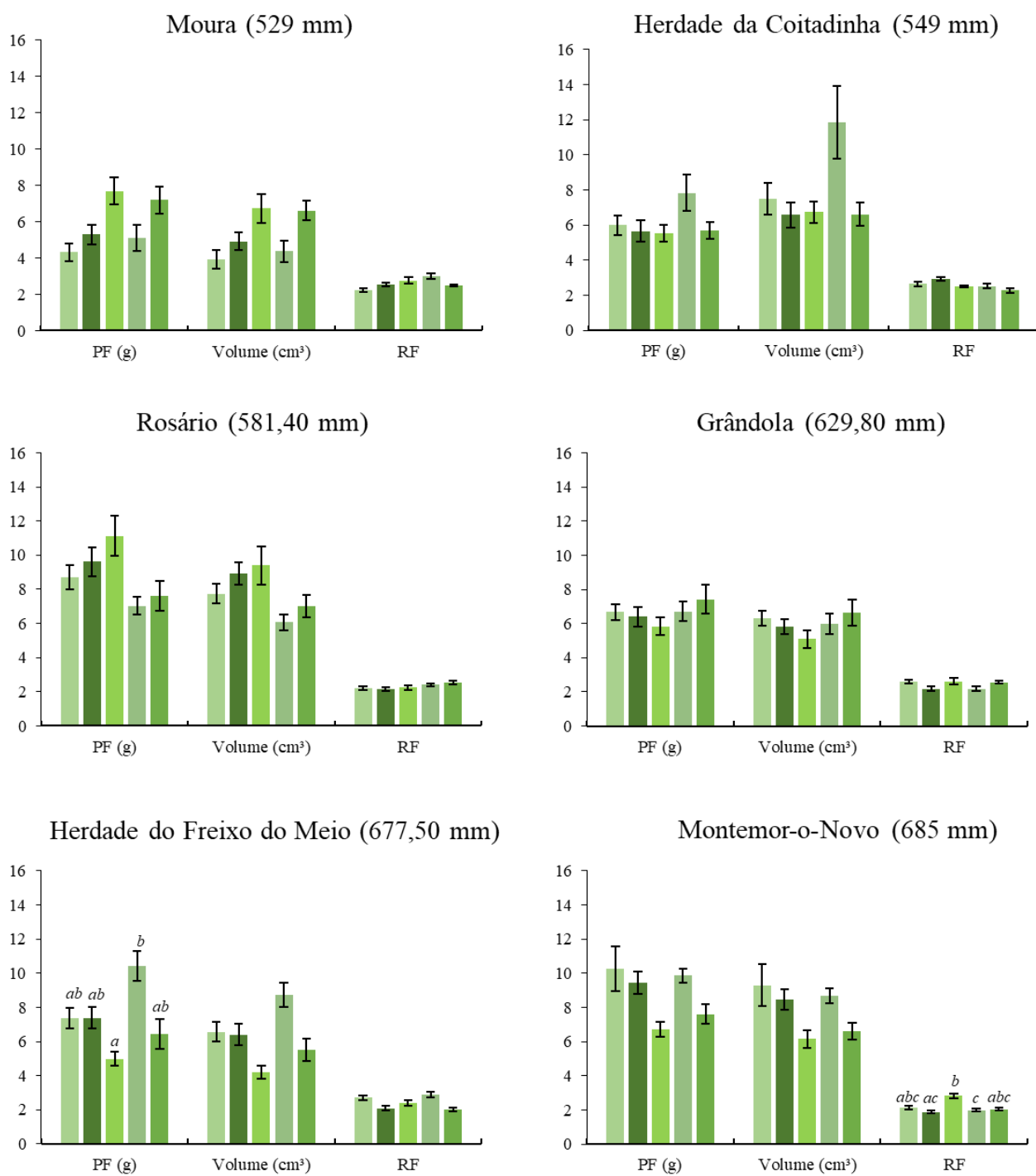


Figura 8 - Peso Fresco (PF) (g), Volume (cm³) e Rácio da Forma (RF) para as cinco amostras de cada local em estudo. As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre amostras, utilizando o teste *Kruskal-Wallis* para $p < 0,05$, N=15.

Adicionalmente, quando relacionadas com a precipitação média anual, não foram encontradas correlações significativas para os valores dos volumes das bolotas amostradas e para os respectivos pesos frescos (Tabela S1.1). Relativamente ao rácio (RF) usado para categorizar a forma das bolotas, podemos observar uma ligeira relação negativa com o aumento da precipitação média anual (Figura 9).

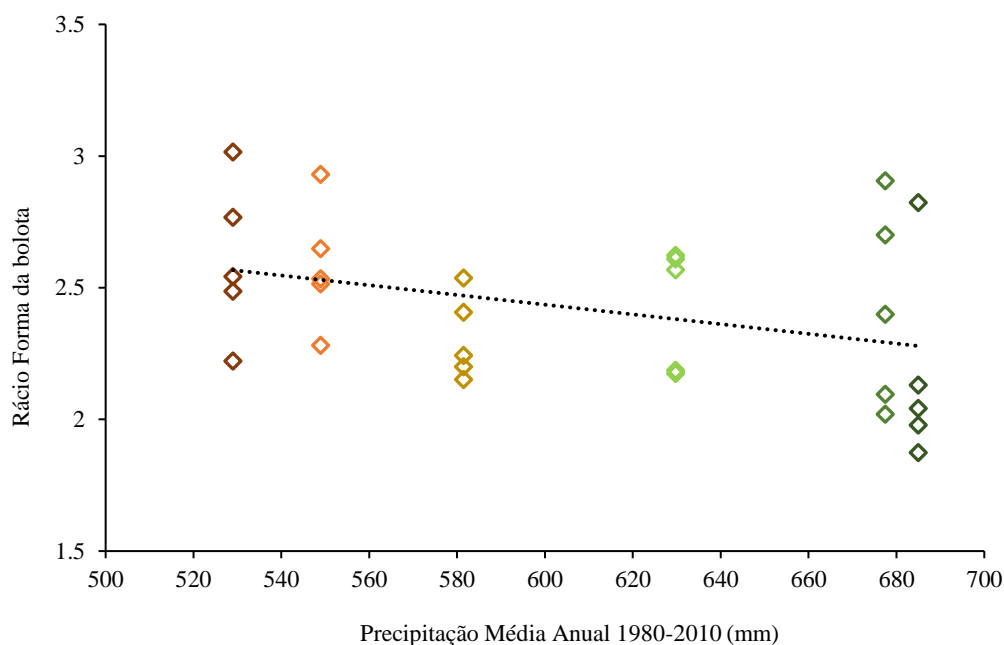


Figura 9 - Rácio da forma médio para cada amostra ao longo do gradiente macroclimático de precipitação média anual; amostras compostas de bolotas (N=15) dos 6 locais de recolha. Cada cor representa um dos seis locais de recolha. A linha representa a tendência observada quando ajustados os valores ao modelo linear generalizado ($p < 0,05$; $R^2=0,1045$; Tabela S1.1).

Na Figura 10 são apresentadas as amostras separadas por PMA evidenciando diferenças visuais na forma e cor entre amostras. Também se observa que dentro de uma mesma árvore, as bolotas apresentam características semelhantes entre si.

Através da categorização em três classes (segundo o RF, para cada amostra), podemos verificar que as amostras de três dos seis locais amostrados, com níveis de PMA de 529, 549 e 677,5, respetivamente, variam entre as três categorias (I, II e III). Nos restantes locais as amostras distribuem-se apenas por duas das categorias: Rosário e Grândola apenas nas categorias I e II e Montemor-o-Novo apresentando quatro das cinco amostras na categoria I, com exceção de uma que apresenta valores de RF representativas da categoria III.

Além disso também é possível observar-se que para amostras de Grândola, de Moura e da Herdade da Coitadinha ocorre maior número de amostras na categoria intermédia (II).

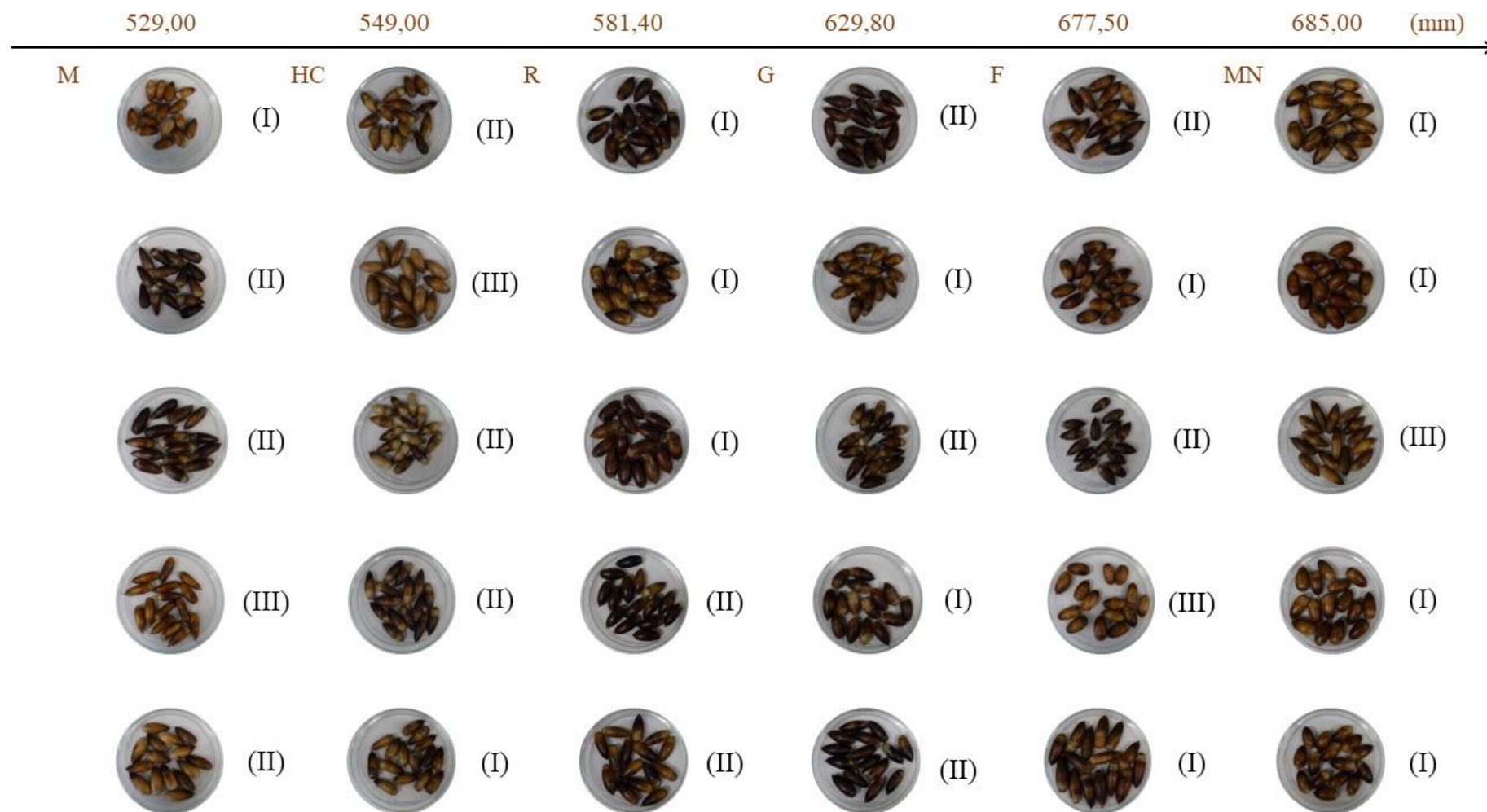


Figura 10 - Representação esquemática com fotografias, das bolotas de cada uma das amostras (árvores) e respetiva categoria de RF (I, II ou III), ao longo do gradiente macroclimático de precipitação média anual; M - Moura; HC - Herdade da Coitadinha; R - Rosário; G - Grândola; F - Herdade do Freixo do Meio; MN - Montemor-o-Novo.

3.2. Conteúdo hídrico e parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura das bolotas

Não foram detetadas diferenças significativas entre árvores de um mesmo local relativamente ao conteúdo hídrico e aos parâmetros bioquímicos estudados (hidratos de carbono não estruturais e fenóis totais) com o teste *Kruskal-Wallis* $p < 0,05$.

Em relação ao conteúdo hídrico (CH), apresentado em percentagem (Tabela 5), pode observar-se que variou entre cerca de 15 e 24%, sendo que o valor mínimo pertence ao local com maior PMA e o valor máximo ao valor com menor PMA.

Na análise dos hidratos de carbono não estruturais, o amido apresentou maior concentração em todas as amostras compostas, relativamente às concentrações dos hidratos de carbono solúveis, variando de cerca de 37 a 88 mg g⁻¹ PS de amostra. Além disso, nos hidratos de carbono solúveis, verificou-se que as concentrações variaram de cerca de 4 a 22 mg g⁻¹ PS para a D-glucose, de 6 a 19 mg g⁻¹ PS para a D-frutose e de 5 a 31 mg g⁻¹ PS para a sacarose, sendo este último hidrato de carbono o que apresentou maior variação nos seus valores (Tabela 5).

Observou-se também que a concentração total de hidratos de carbono solúveis (D-glucose, D-frutose e sacarose) e de amido era muito superior à concentração fenólica pelo peso seco de amostra, que variou de cerca de seis a 13 mg g⁻¹ PS de amostra.

Tabela 5 - Média e desvio-padrão do Conteúdo Hídrico (CH) e das concentrações por peso seco (PS) de D-glucose, D-frutose, sacarose, amido e fenóis totais, obtidos a partir das amostras compostas de bolotas para cada árvore recolhida (N=8); as letras minúsculas marcam as diferenças significativas entre locais de recolha, utilizando o teste *Kruskal-Wallis*, para $p < 0,05$.

PMA	CH (%)	[D-glucose] (mg g ⁻¹ PS)	[D-frutose] (mg g ⁻¹ PS)	[Sacarose] (mg g ⁻¹ PS)	[Amido] (mg g ⁻¹ PS)	[Fenóis Totais] (meqAG g ⁻¹ PS)
529	24.1 (± 4.4) ^a	22.4 (± 3.5) ^a	19.3 (± 3.4) ^a	7.0 (± 3.3)	82.6 (± 12.9) ^a	8.3 (± 4.5) ^{ac}
549	19.9 (± 2.8) ^{abc}	14.4 (± 2.3) ^{ac}	13.5 (± 1.5) ^{ac}	31.9 (± 6.3)	82.2 (± 5.3) ^a	6.9 (± 4.1) ^a
581,4	20.8 (± 1.9) ^{ab}	12.9 (± 4.7) ^{ab}	12.8 (± 2.8) ^{ad}	5.3 (± 4.5)	81.1 (± 7.9) ^a	11.0 (± 4.1) ^{abc}
629,8	20.2 (± 2.1) ^{ab}	6.0 (± 1.9) ^b	6.5 (± 1.3) ^b	11.7 (± 5.9)	67.0 (± 13.9) ^{ab}	8.6 (± 2.3) ^{abc}
677,5	18.3 (± 2.7) ^{bc}	4.8 (± 3.0) ^b	6.1 (± 3.7) ^{bcd}	12.4 (± 7.5)	37.9 (± 6.5) ^b	13.2 (± 7.0) ^{bc}
685	15.4 (± 3.5) ^c	7.9 (± 4.8) ^{bc}	8.1 (± 3.3) ^{bd}	23.9 (± 6.5)	38.4 (± 1.2) ^b	13.9 (± 2.6) ^b

Em relação à variabilidade entre os seis locais de recolha, obtiveram-se diferenças significativas para todos os parâmetros, utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* para $p < 0,05$, à exceção das concentrações de sacarose nas amostras. Para o conteúdo hídrico, observaram-se diferenças significativas entre as amostras de Moura e da Herdade do Freixo do Meio. E também entre Montemor e Moura, Rosário e Grândola, respetivamente. As concentrações de amido também apresentaram diferenças significativas entre os dois locais com maior PMA (Montemor-o-Novo e Herdade do Freixo do Meio) e os três locais com menor PMA (Rosário, Herdade da Coitadinha e Moura), respetivamente.

3.2.1. Influência da precipitação média anual no conteúdo hídrico e em parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura

O conteúdo hídrico determinado em cinco árvores de cada local de amostragem, e cujos valores médios por local de amostragem são apresentados na tabela 2, decresce significativamente com o aumento da PMA (Figura 11).

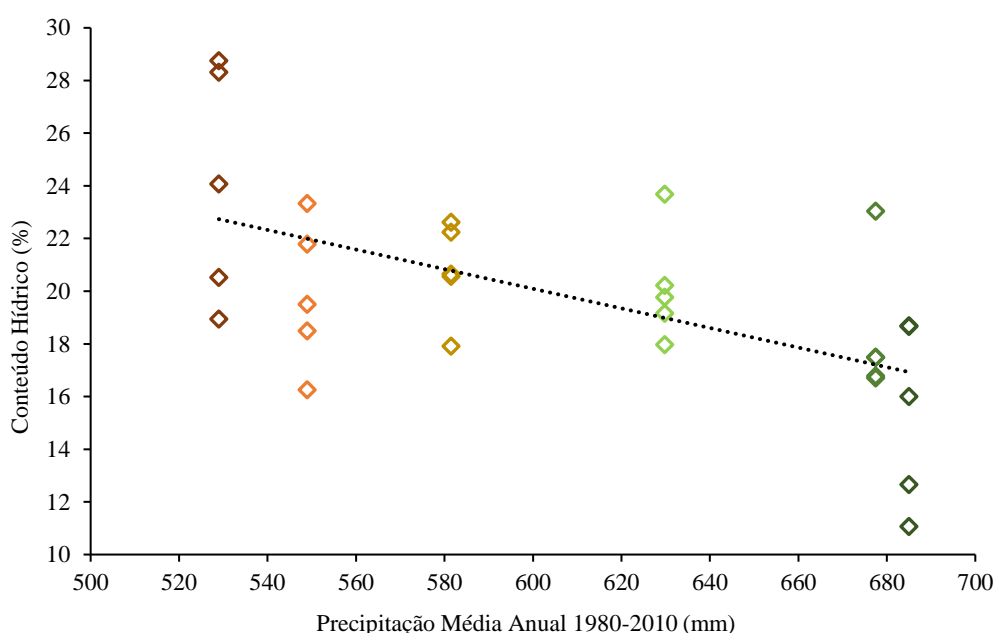


Figura 11 - Conteúdo hídrico médio de cada amostra ao longo do aumento da precipitação média anual; amostras compostas de bolotas (N=8) para cada árvore amostrada dos 6 locais de recolha. Cada cor representa um dos seis locais de recolha. A linha representa a tendência observada quando ajustados os valores ao modelo linear generalizado ($p < 0,001$; $R^2=0,3301$).

A variação do conteúdo em hidratos de carbono com a precipitação média anual é apresentada na Figura 12. O teor total de hidratos de carbono não estruturais (D-glucose + D-frutose + sacarose + amido) decresce significativamente com o aumento do PAM (Figura 12.A), tendência idêntica à que se observa para a D-glucose (Figura 12.C), D-frutose (Figuras 12.D) e amido (Figura 12.F).

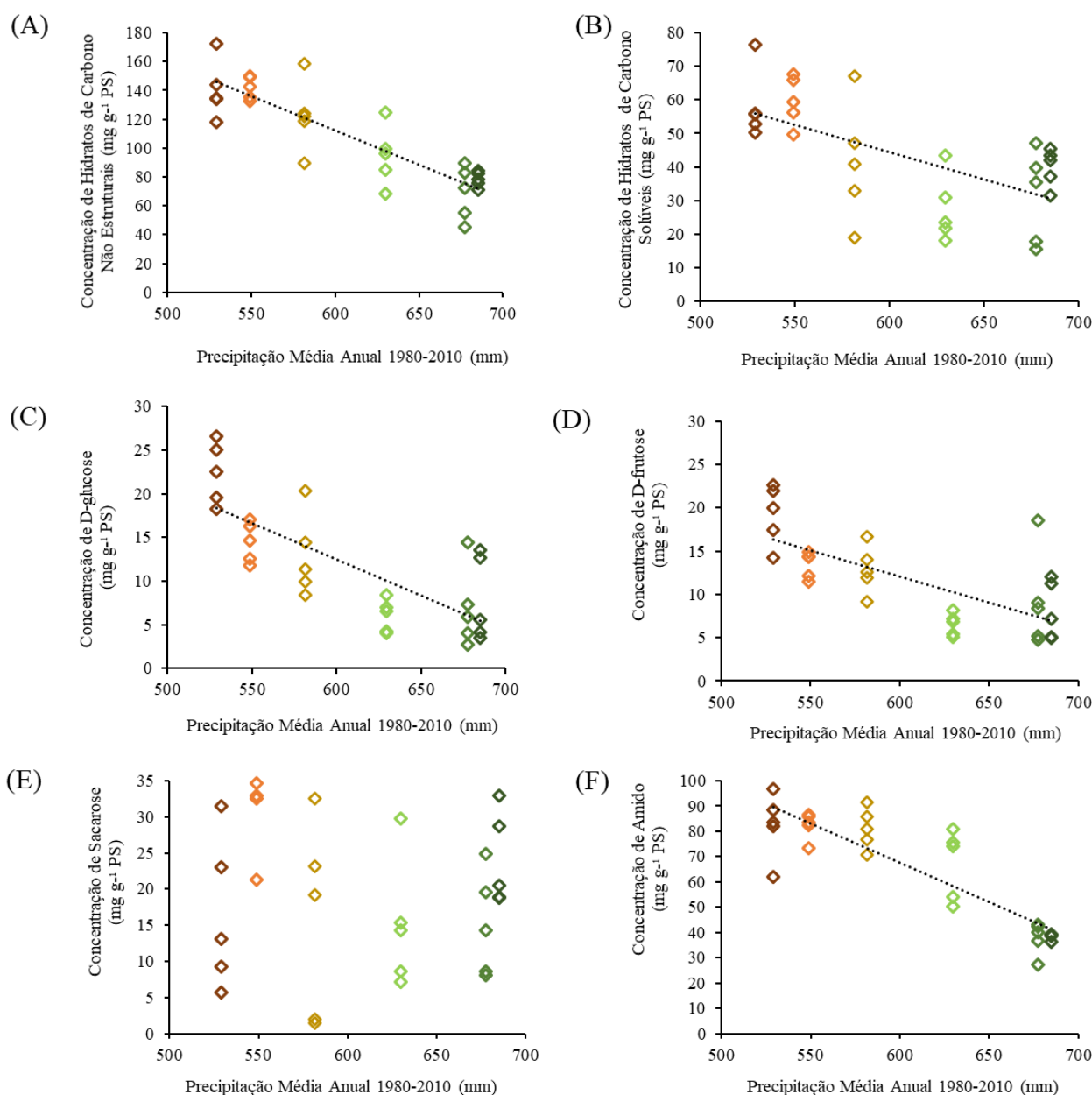


Figura 12 - Concentração de hidratos de carbono não estruturais ao longo do gradiente de precipitação média anual; amostras compostas de bolotas (N=8) para cada árvore amostrada dos 6 locais de recolha. Cada cor representa um dos seis locais de recolha. A linha representa a tendência observada quando ajustados os valores ao modelo linear generalizado. (A) Concentração total de hidratos de carbono não estruturais, D-glucose + D-frutose + sacarose + amido ($p < 0,001$; $R^2 = 0,7371$). (B) Concentração de hidratos de carbono solúveis: D-glucose + D-frutose + sacarose ($p < 0,001$; $R^2 = 0,3529$). (C) Concentração de D-glucose ($p < 0,001$; $R^2 = 0,5472$). (D) Concentração de D-frutose ($p < 0,001$; $R^2 = 0,4669$). (E) Concentração de sacarose ($p > 0,5$; $R^2 = -0,02031$). (F) Concentração de amido ($p < 0,001$; $R^2 = 0,7626$).

A concentração de sacarose não apresentou qualquer tendência de variação com a PMA (Figura 12.E), ao contrário dos restantes hidratos de carbono, existindo sempre uma elevada variabilidade no teor em sacarose em cada local de amostragem.

Apesar do que se verificou para a sacarose, a concentração total dos hidratos de carbono solúveis (D-glucose, D-frutose e sacarose) decresce significativamente com o aumento da PMA (Figura 12.B).

A razão entre o conteúdo em hidratos de carbono solúveis e amido, insolúvel, não apresentou uma tendência significativa de variação com a precipitação média anual ($N=8$; $p > 0,1$; $R^2 = 0,07384$), embora aparente decrescer com o aumento da PMA até cerca de 650 mm. Na gama de PMA entre aproximadamente 500-650 mm, o rácio apresentado foi sempre inferior à unidade, evidenciando o maior conteúdo em amido das bolotas proporcionalmente aos restantes hidratos de carbono.

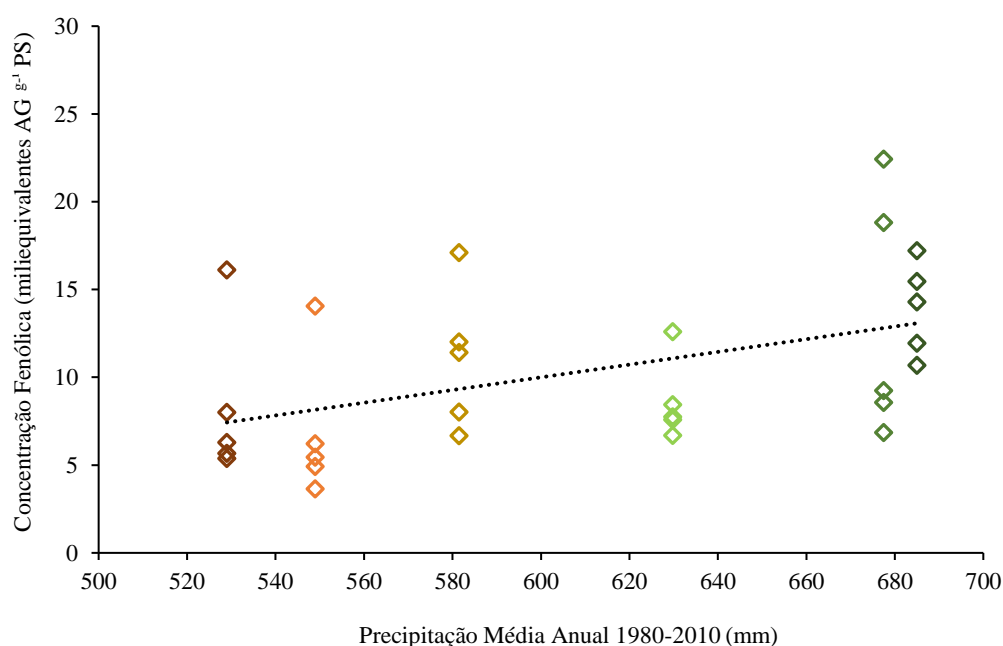


Figura 13 - Concentração fenólica ao longo do gradiente de precipitação média anual; amostras compostas de bolotas ($N=8$) para cada árvore amostrada dos 6 locais de recolha. Cada cor representa um dos seis locais de recolha. A linha representa a tendência observada quando ajustados os valores ao modelo linear generalizado ($p < 0,01$; $R^2=0,1863$).

A concentração de fenóis totais aumentou com o aumento da PMA (Figura 13), mostrando uma tendência inversa à observada para os hidratos de carbono não estruturais e realçando a variação mostrada no tópico anterior entre hidratos de carbono não estruturais e fenóis.

3.2.2. Influência do RF no conteúdo hídrico e em parâmetros bioquímicos associados à percepção de doçura

Depois de analisados os resultados dos parâmetros morfométricos e bioquímicos e as suas relações face ao gradiente macroclimático utilizado, é ainda importante realçar os resultados obtidos relacionando os dois tipos de parâmetros testados.

Em relação ao peso fresco e ao volume das bolotas, nenhuma correlação significativa foi encontrada com o seu conteúdo hídrico, o total de hidratos de carbono não estruturais e fenóis totais (Tabela S1.1). Em relação à forma das bolotas, relacionou-se também o rácio da forma com o conteúdo hídrico das bolotas, total de hidratos de carbono não estruturais e de fenóis.

Também não se observou uma relação linear entre a forma das bolotas e o seu conteúdo hídrico ($N=8$, $p > 0,1$; $R^2= 0,03229$), ou o conteúdo total em hidratos de carbono não estruturais ($N=8$, $p > 0,05$; $R^2= 0,09918$).

No entanto, encontrou-se uma relação negativa entre a concentração fenólica e o rácio da forma, como mostra a Figura 14. Isto é, para as amostras em estudo, bolotas mais alongadas têm tendencialmente menor conteúdo em fenóis.

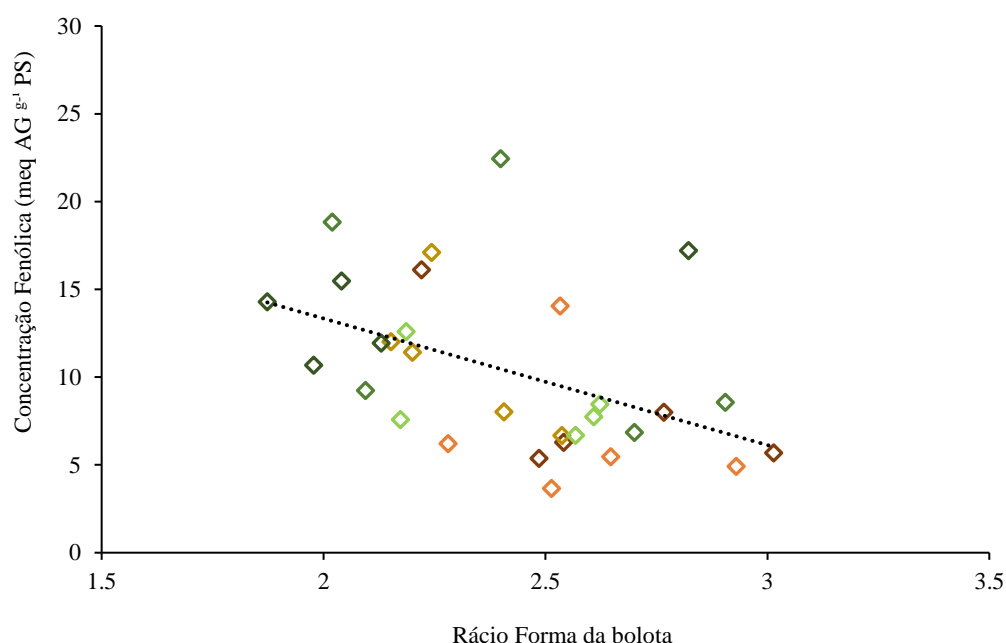


Figura 14 - Concentração fenólica ao longo do aumento do rácio da forma médio; amostras compostas de bolotas ($N=8$) para cada árvore amostrada dos 6 locais de recolha. Cada cor representa um dos seis locais de recolha. A linha representa a tendência observada quando ajustados os valores ao modelo linear generalizado ($p < 0,01$; $R^2=0,1864$).

4. Discussão

O conhecimento das variações na composição química das bolotas de azinheira, ao longo de um gradiente climático de precipitação, permite-nos estabelecer previsões acerca da sua doçura num cenário de aumento de aridez. Além disso, o conhecimento de como a doçura se relaciona com a morfologia das bolotas, ajuda-nos a decodificar crenças do povo sobre como reconhecer as bolotas mais agradáveis, apoiando o regresso da integração de bolotas de azinheira na alimentação humana.

4.1. Variação no conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais das bolotas ao longo de um gradiente de precipitação

Os parâmetros bioquímicos em foco foram considerados os mais relevantes para a perceção da doçura das bolotas: hidratos de carbono não estruturais e fenóis. Foram encontradas diferenças significativas no conteúdo em hidratos de carbono e em fenóis para amostras de locais diferentes, sugerindo a existência de variação na composição bioquímica causadas pelas diferentes condições edafoclimáticas (Fleck *et al.*, 1990). No entanto, para as amostras testadas, a variabilidade entre amostras do mesmo local é menor que entre locais diferentes, para os parâmetros acima referidos, contrariando o que seria esperado de acordo com Geo-Izquierdo *et al.* (2006), atribuindo a razão à variabilidade genética.

O conteúdo em hidratos de carbono não estruturais diminuiu com o aumento da precipitação média anual, de acordo com o que foi descrito por Galván *et al.* (2012), ou seja, em locais onde a precipitação era menor, as bolotas apresentaram maiores concentrações de hidratos de carbono nas suas reservas nutritivas. Esta diminuição observou-se para a D-glucose e D-frutose, e também para o amido, o maior constituinte do endosperma das bolotas (Geo-Izquierdo *et al.*, 2006). Isto poderá indicar uma estratégia adaptativa da espécie a condições mais desfavoráveis, investindo no conteúdo das sementes, se pensarmos numa perspetiva de germinação (Hill, 2010). A sacarose, açúcar solúvel não redutor, dímero de D-glucose e D-frutose, não apresentou uma correlação significativa com a precipitação média anual. Dado que a hidrólise da sacarose resulta na formação em D-glucose e D-frutose, foi também testada a razão entre as concentrações dos açúcares solúveis redutores e a concentração de sacarose, que não apresentou qualquer tendência linear com a precipitação média anual. Sendo a razão constante ao longo da variável contínua, alterações nas concentrações de D-glucose e D-frutose face a essa mesma variável, não terão resultado de alterações na hidrólise ou síntese de sacarose (Yamamori *et al.*, 2016).

Adicionalmente, testou-se também a razão entre os hidratos de carbono solúveis e os insolúveis (amido), não apresentando correlação significativa com a precipitação média anual, o que sugere que, uma vez que a concentração em amido é geralmente superior à concentração de açúcares solúveis, uma maior perceção de doçura poderá ser maior em bolotas com concentrações de amido superiores. A maior perceção de doçura acontece porque a α -amílase presente na saliva degrada o amido mais tardiamente e, por ficar mais tempo na boca, provoca a sensação de maior doçura (Lim e Pulicín, 2019).

Os valores que se obtiveram neste estudo, para os parâmetros químicos testados, são inferiores aos referenciados na bibliografia. Em relação à concentração de hidratos de carbono solúveis, os resultados obtidos estão abaixo das percentagens por grama de 11-18% referidas por Oliveira (2014). Para o amido, os valores de bibliografia vão de 535 mg g⁻¹ PS (Oliveira *et al.*, 2012) a 920 mg g⁻¹ PS (Pacheco, 2015), sendo que os resultados que se obtiveram não passaram dos 82,60 mg g⁻¹ PS. No presente trabalho a quantificação foi feita com base em farinha seca a 70°C, numa tentativa de mimetizar a secagem vulgarmente utilizada das bolotas para consumo humano; o que poderá ter promovido a hidrólise do amido, daí originando os valores mais baixos.

Ao testarmos a concentração de fenóis totais, pretendíamos reconhecer, indiretamente, amostras com maior conteúdo em taninos e, como tal, bolotas mais amargas e adstringentes (Oliveira *et al.*, 2012). A concentração de fenóis totais apresentou uma correlação positiva com o aumento da precipitação média anual, sugerindo que bolotas mais amargas se encontram tendencialmente em locais mais húmidos (onde a precipitação é maior). Este resultado, sendo inverso ao obtido para os hidratos de carbono, sugere que num cenário em que a precipitação média anual diminua (maior aridez), a perceção da doçura das bolotas aumente, uma vez que apresentam concentrações superiores de hidratos de carbono e inferiores de compostos fenólicos.

Para as concentrações fenólicas das amostras estudadas (máximo 13,91 mEAG g⁻¹ PS), também se obtiveram valores inferiores ao intervalo de valores publicados (19 a 2000 mEAG g⁻¹ PS) por Cantos *et al.* (2003), Oliveira *et al.* (2012) e Pacheco (2015); ainda que tenhamos de considerar que a metodologia utilizada para a sua quantificação tenha sido diferente e, segundo Rakić (2007) e Łuczaj *et al.* (2014), o conteúdo em taninos dependerá do método de secagem e extração das amostras.

Variações nas concentrações de taninos foram descritas e explicadas por respostas individuais ou coletivas das árvores a danos ocorridos, alterações sazonais, maturação dos próprios frutos, diferentes genótipos e variações locais (Fleck *et al.*, 1990). Segundo Frutos *et al.* (2004) é, particularmente, observado um aumento no teor de taninos nas plantas quando expostas a altas temperaturas, stress hídrico, excesso de intensidade luminosa e baixa qualidade no solo, o que pode explicar que bolotas com menos água, apresentem mais fenóis totais, onde se incluem os taninos. Foi isso que se observou ao relacionarmos os resultados obtidos do teor em fenóis totais com o conteúdo hídrico médio das amostras; verificamos que apresentaram uma correlação negativa, também observada nos fenóis totais ao longo do gradiente climático de precipitação

A percentagem média de água (conteúdo hídrico) revelou, uma correlação negativa com a precipitação média anual. A variação do conteúdo hídrico, a par com a variação em hidratos de carbono, pode estar relacionada com a capacidade dos hidratos de carbono em reter água e, assim, proteger as sementes da dessecação (Vazquez, 1998; Merouani, 2003). Sabendo que todas as amostras foram tratadas sob as mesmas condições, também não é de excluir que estes resultados possam ser explicados pelas variações e condições sazonais no ano da colheita das amostras, como por exemplo a temperatura.

Contudo, seriam necessários estudos complementares ao longo de uma escala temporal para que se avaliassem essas diferenças.

4.2. Variação no conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e em fenóis totais das bolotas face a diferenças na sua forma

A sabedoria popular indica que as bolotas mais doces são mais arredondadas. Ao utilizarmos a razão entre o comprimento e o diâmetro das bolotas (RF - rácio da forma), sabemos que quanto mais próximos estes dois valores estiverem, mais a forma da bolota se aproximará de uma esfera. Como tal, bolotas mais arredondadas terão rácios mais próximos de um e bolotas mais alongadas terão rácios mais elevados.

A concentração fenólica variou com rácio da forma, revelando que bolotas mais alongadas terão menos fenóis totais na sua composição, e por essa razão, não revelando tanto amargor, poderem ser consideradas mais doces. Contudo, não foi encontrada qualquer relação entre o rácio da forma e a concentração em hidratos de carbono não estruturais, que seriam os responsáveis pela doçura, pelo que a hipótese de que bolotas mais redondas seriam mais doces não é suportada pelo presente estudo. Mesmo que se considere que a perceção de doçura resulte do balanço entre os hidratos de carbono e os fenóis, também não seriam as bolotas mais redondas as mais apetecíveis. Geo-Izquierdo *et al.* (2006), indica que são encontradas diferenças químicas para amostras com morfologias semelhantes, atribuindo a razão à variabilidade genética.

Analisados os parâmetros morfométricos das bolotas selecionadas, observou-se que bolotas recolhidas de um mesmo indivíduo eram visualmente semelhantes entre si. No entanto, apresentaram diferenças no aspeto morfológico quando comparadas com bolotas amostradas de outras árvores, pertencessem ou não ao mesmo local de colheita. Esta primeira abordagem deu-nos a entender que existiria variabilidade entre amostras recolhidas no mesmo local do gradiente e entre amostras recolhidas em locais diferentes. Contudo, apesar destas diferenças detetadas visualmente, a variabilidade entre os pesos frescos, volumes ou rácios de bolotas recolhidas dentro da mesma área geográfica, foi inferior à variabilidade entre locais, ao contrário da descrição de Galván *et al.* (2012) que refere diferenças morfológicas significativas ao nível populacional. Esta ausência de diferenças significativas poderá ser justificada pelo reduzido número de indivíduos amostrados em cada local e por terem sido selecionadas as bolotas com maior desenvolvimento/calibre; sendo importante salientar que o desenho experimental deste trabalho foi idealizado primeiramente para entender as diferenças ao longo do gradiente macroclimático e, portanto, em relação à variável contínua, a precipitação média anual.

Ocorreram, no entanto, diferenças significativas nos volumes e pesos frescos entre amostras de locais diferentes. Apesar de não se ter observado uma relação linear significativa entre a precipitação média anual e o volume e peso fresco das bolotas, ou o seu rácio RF, algumas das diferenças observadas

ocorreram entre locais com precipitações médias anuais em extremos opostos dentro do gradiente em estudo, sugerindo que com um maior número de amostras fosse possível encontrar uma relação entre os parâmetros referidos acima e a precipitação média anual.

5. Conclusão

Este estudo surgiu e contribuiu para dar resposta à necessidade de compreender melhor a “doçura” característica de algumas bolotas da espécie *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* e tentar acrescentar-lhe valor: valor comercial ao fruto e valor em serviços de ecossistema à espécie, que começa a apresentar sinais de declínio no nosso país com o aumento da aridez.

Numa perspetiva societal, aumentou o conhecimento sobre as bolotas “doces” e, portanto, mais apetecíveis para o consumidor, e revelou-se importante pela interação entre a Ciência e o conhecimento empírico que serviu de mote à escolha deste tema. Por outro lado, perante uma abordagem académica, obtiveram-se resultados relevantes para servirem de base a estudos futuros sobre a relação entre a forma das bolotas e a sua composição química ao longo de um gradiente.

Concluiu-se que concentrações médias mais elevadas de hidratos de carbono não estruturais tendencialmente correspondem a níveis de precipitação média anual inferiores. Relação que é positiva para as concentrações de amido e de hidratos de carbono solúveis, e que é negativa para concentrações fenólicas. Deste modo, num cenário de alterações climáticas em que o aumento da aridez se intensifique na zona sul do nosso país, a tendência obtida sugere bolotas com maiores concentrações de amido, D-glucose e D-frutose e menores concentrações fenólicas na sua composição e, como tal, bolotas mais “doces”.

Adicionalmente, concluiu-se que a forma das bolotas apresenta apenas, através do rácio entre o seu comprimento e diâmetro, uma ligeira relação negativa com a concentração fenólica total, não apresentando qualquer relação com a sua composição em hidratos de carbono não estruturais e, portanto, não sendo suficiente para se afirmar que bolotas mais redondas são mais “doces”.

5.1. Perspetivas futuras

Deste trabalho, embora preliminar, concluíram-se aspetos importantes em relação ao conteúdo em hidratos de carbono não estruturais e de como este poderá ser influenciado pela precipitação média anual. Porém, falta compreender com mais detalhe a composição em fenóis das bolotas, em particular, dos taninos (principais responsáveis pelo amargor) ao invés de fenóis totais, e outros parâmetros e fatores a explorar que possam influenciar a perceção de doçura das bolotas de azinheira, como o seu índice de acidez. Seria também importante repetir este tipo de estudo, aumentando o número de amostras por local, e além da precipitação média anual, acrescentar a temperatura como variável

preditora e análises ao solo em cada local de colheita, de modo a encontrar outros fatores de variabilidade.

Além disso, seria relevante comparar os parâmetros de uma amostra com bolotas consideradas “doces” pelos consumidores com as tendências obtidas para os parâmetros em estudo ao longo do gradiente climático. Foi feita uma primeira aproximação (Apêndice II), mas a quantidade de bolotas recolhidas não foi suficiente para sistematizar esta abordagem.

Adicionalmente, analisar também a variabilidade apresentada em bolotas de uma mesma árvore em relação a características morfométricas e parâmetros bioquímicos relacionados com a percepção de doçura, realizando ensaios bioquímicos individuais a amostras escolhidas de bolotas.

Por último, tentar compreender como se distribuem espacialmente as árvores com bolota doce no montado e qual a estratégia adotada pela espécie tendo em conta que só algumas árvores apresentam essa característica; mapeando as árvores produtoras de bolota “doce” para que possam ser comparadas fenotípica e geneticamente com azinheiras vizinhas.

Referências bibliográficas

- Almeida J. A. A., Marinho, A. A. N., Baptista M. E. S. (1992). Valor nutritivo da balota e da lande. II Colóquio sobre el cerdo ibérico, 9-10. Junta de Extremadura. Badajoz - España.
- Amorim, R. (1987) Da Mão à Boca – Para uma História da Alimentação em Portugal, Edições Salamandra.
- Arrabaça, M. C. M. N. C. (1981). The effect of temperature on photosynthetic and photorespiratory metabolism. Tese de Doutoramento. Universidade de Londres.
- Bainbridge D. A. (2001). Acorns as food: history, use, recipes, and bibliography. Calif., U.S.A.: Sierra Nature Prints.
- Bainbridge, D. A. (1986). *Quercus*, a multi-purpose tree for temperate climates. *International Tree Crops Journal*, 3(4), 291-298.
- Barrow, C. J. (1992). World atlas of desertification (United nations environment programme), edited by N. Middleton & DSG Thomas. Edward Arnold, London. *Land Degradation & Development*, 3(4), 249-249.
- Benito Garzón, M., Sánchez De Dios, R., & Sainz Ollero, H. (2008). Effects of climate change on the distribution of Iberian tree species. *Applied Vegetation Science*, 11: 169–178.
- Bernardes da Silva, A., Silvestre, S., Marques Da Silva, J., Antunes, M., Matos, A. R., Arrabaça, J., Raimundo, D., Soares, J., Rodrigues, B., Pires, S., Ribeiro, D., Martins, C., Leão de Sousa, M. (2018). Variação sazonal do conteúdo em fotoassimilados em folhas e frutos de pera ‘Rocha’. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 29, 15-22.
- Bonito, A., Varone, L., & Gratani, L. (2011). Relationship between acorn size and seedling morphological and physiological traits of *Quercus ilex* L. from different climates. *Photosynthetica*, 49(1), 75.
- Bugalho, M., Plieninger, T., Aronson, J., Ellatifi, M., & Crespo, D.G. (2009). Chapter 3 - Open Woodlands: A Diversity of Uses (and Overuses). Cork Oak Woodlands on the Edge: Ecology, Adaptive Management, and Restoration, Island Press. Washington DC, pp. 33–48.
- Bugalho, M.N., Caldeira, M.C., Pereira, J.S., Aronson, J., & Pausas, J.G. (2011). Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9: 278–286.

- Cañellas, I. et al. (2007). An approach to acorn production in Iberian dehesas. *Agroforest Syst.*, 70:3-9.
- Cantos, E., Espín, J. C., López-Bote, C., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6248-6255.
- Carevic, F. S., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez-Piqué, J., Tapias, R., Corral, E., & Domingo, J. (2010). Plant water relations and edaphoclimatic conditions affecting acorn production in a holm oak (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) open woodland. *Agroforestry Systems*, 78(3), 299-308.
- Castro, F. C. A. M., (2009). Efeito dos taninos da bolota na digestibilidade da proteína bruta de dietas de porcos alentejanos de montanha. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Cherlet, M., Hutchinson, C., Reynolds, J.N., Hill, J., Sommer, S., & Von Maltitz, G. (2018). *World Atlas of Desertification: Rethinking land degradation and sustainable land management*. Luxemburg. pp 247.
- Coelho, A. C., Lima, M. B., Neves, D., & Cravador, A. (2006). Genetic diversity of two evergreen oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP markers. *Silvae Genetica*, 55(1-6), 105-118.
- Cooper, T., Arblaster, K., Baldock, D., Farmer, M., Beaufoy, G., Jones, Poux X., McCracken D., Bignal E., Elbersen B., Wascher D., Angelstam P. Roberge J. Pointereau P., Seffer J. & Galvanek D. (2007). Final report for the study on HNV indicators for evaluation. Institute for European Environmental Policy. London, pp 186.
- Corcobado, T., Cubera, E., Juárez, E., Moreno, G., & Solla, A. (2014). Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 192–193: 1–8.
- Corcobado, T., Cubera, E., Moreno, G., & Solla, A. (2013). *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 169: 92–99.
- Costa, A.C., Durão, R., Pereira, M.J., & Soares, A. (2008). Using stochastic space-time models to map extreme precipitation in southern Portugal. *Natural Hazards and Earth System Science*, 8: 763– 773.

Duarte, B., Santos, D., & Caçador, I. (2013). Halophyte anti-oxidant feedback seasonality in two salt marshes with different degrees of metal contamination: search for an efficient biomarker. *Functional Plant Biology*, 40(9), 922-930.

Fernández, I., Gómez, A., Moreno, P., Fernández, P., de Pedro, E., Díaz, E. and Sánchez, L. (2005). Características de las bellotas de encina (*Quercus ilex*) en diferentes zonas del Valle de los Pedroches (Córdoba). Inventario bromatológico. In: Proceedings of the XLV Meeting of the SEEP, Gijón (Spain), 30 May-3 June 2005, Osoro, K., Argamenteira, A. and Larraceleta, A. (Eds). Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Asturias, Spain, pp. 383-389.

Figueiredo, T. D., Fonseca, F., & Nunes, L. (2015). Proteção do solo e combate à desertificação: oportunidade para as regiões transfronteiriças. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.

Fleck, David C. & Layne, James N. (1990). Variation in tannin activity of acorns of seven species of central Florida oaks. *Journal of Chemical Ecology*, 16.10: 2925-2934.

Fonseca, A. (2015). O consumo da Bolota na história de Portugal. Symp ABOLOTA o futuro de um alimento com passado. Herdade do Freixo do Meio. 20 Mar., Montemor-o-Novo.

Franco, J. A. (1997). *Quercus* L. in Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.). Flora iberica 2: 15-35. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, Á. R. (2004). Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2:191–202.

Galván J., Jorrín Novo J. J., Cabrera A. G. (2012). Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). *Eur J For Res* 131:893–904. doi: 10.1007/s10342-011-0563-8.

García-Gómez, E., Pérez-Badía, R., Pereira, J., & Puri, R. K. (2017). The Consumption of Acorns (from *Quercus* spp.) in the Central West of the Iberian Peninsula in the 20th Century. *Economic Botany*, 71(3), 256-268.

Garrido, J. L.; Rey, P. J.; Herrera, C. M. (2005). Fuentes de variación en el tamaño de la semilla de la herbácea perenne *Helleborus foetidus* L. (*Ranunculaceae*). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 62(1), 115-125.

Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., & Montero, G. (2006). Acorn production in Spanish holm oak woodlands. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 15: 339.

- Giorgi F., Lionello P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob Planet Change*, 63:90–104. doi: 10.1016/j.gloplacha.2007.09.005.
- Godinho, S., Guiomar, N., Machado, R., Santos, P., Sá-Sousa, P., Fernandes, J.P., Neves, N., & PintoCorreia, T. (2016). Assessment of environment, land management, and spatial variables on recent changes in montado land cover in southern Portugal. *Agroforestry Systems* 90: 177–192.
- Godinho, S., Santos, A.P., & Sá-Sousa, P. (2011). Montado management effects on the abundance and conservation of reptiles in Alentejo, Southern Portugal. *Agroforestry Systems* 82: 197–207.
- Hesíodo (1978) *Os Trabalhos e os Dias*. Obras e fragmentos. Tradução e notas de Aurélio Pérez Jiménez e Afonso Martínez Díez, Editorial Gredos., N°13. Madrid.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology: A Journal of the Royal Meteorological Society*, 25(15), 1965-1978.
- Hill, J. P., & Edwards, W. (2010). Dispersal of desiccation-sensitive seeds is not coincident with high rainfall in a seasonal tropical forest in Australia. *Biotropica*, 42(3), 271-275.
- Jayasena, V., & Cameron, I. (2008). ° Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson Seedless table grapes. *Journal of Food Quality*, 31(6), 736-750.
- Koenig W. D., Knops J. M. H., Dickinson J. L., Zuckerberg B. (2009). Latitudinal decrease in acorn size in bur oak (*Quercus macrocarpa*) is due to environmental constraints, not avian dispersal. *Botany*, 87:349–356. doi: 10.1139/B09-008.
- Lim, J., & Pullicin, A. J. (2019). Oral carbohydrate sensing: Beyond sweet taste. *Physiology & behavior*, 202, 14-25.
- Long T. J., Jones R. H. (1996). Seedling growth strategies and seed size effects in fourteen oak species native to different soil moisture habitats. *Trees* 11:1. doi: 10.1007/s004680050051.
- López-Carrasco, C.; Daza, A.; Rey, A.; López-Bote, C., 2004. Efectos de las heladas y los carpófagos (*Curculio* sp.) sobre la calidad de bellotas en una dehesa de Castilla-La Mancha. En: Pastos y ganadería extensiva. Actas de la XLIV Reunión Científica de la S.E.E.P, 427-432. GARCÍA CRIADO *et al.* (Eds.). IRNACSIC.Salamanca - España.
- Luczaj, L., Adamczak, A., & Duda, M. (2014). Tannin content in acorns (*Quercus* spp.) from Poland. *Dendrobiology*, 72.

Matos, F. M. S. R. D. (2011). *Estudo de factores de conservação da bolota doce para a alimentação humana*. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Merouani, H., Apolinário, L. M., Almeida, M. H., & Pereira, J. S. (2003). Morphological and physiological maturation of acorns of cork oak (*Quercus suber* L.). *Seed science and technology*, 31(1), 111-124.

Natividade, J. Vieira (1950). Subericultura. MAPA. DGF, INCM, Lisboa. pp 387.

Oliveira G., Peñuelas J. (2000). Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, 21:97-107.

Oliveira, M.; Machado, M.; Abreu, M. (2012). Acorn chemical composition depending on shedding date and *Quercus* species. In: De Pedro, E.J.; Cabezas, A.B. (eds). 7th Int. Symp Med Pig. Zaragoza: CIHEAM, 229- 234.

Oliveira, T. E. G. D. (2014). *Estudo da bolota de Quercus rotundifolia Lam. como indicador precoce do stress hídrico ao longo de um gradiente climático no Alentejo (SE, Portugal)*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Özcan, T. (2006). Total protein and amino acid compositions in the acorns of Turkish *Quercus* L. taxa. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(2), 419-429.

Pacheco, A. R. P. (2015). Análise nutricional, físico-química e atividade antioxidante de frutos de *Quercus* sp. visando a sua valorização. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Passarinho, J. A., Calha, I. M., & Moreira, A. C. (2019). Montado: Produção de bolota e silvopastorícia. [(Disponível em: http://www.inia.pt/fotos/editor2/montado_producao_de_bolota.pdf, pdf acedido em 30/11/2020)].

Perissé, P. (2002). Semillas un punto de vista agronómico. [(Disponível em: [www.semilla.cyta.com.ar.](http://www.semilla.cyta.com.ar/), pdf acedido em 15/1/2019)].

Pinto C. A., Henriques M. O., Figueiredo J. P., *et al.* (2011). Phenology and growth dynamics in Mediterranean evergreen oaks: Effects of environmental conditions and water relations. *For Ecol Manage* 262:500–508. doi: 10.1016/j.foreco.2011.04.018.

Pinto-Correia, T. (1993). Threatened landscape in Alentejo, Portugal: the «montado» and other «agrosilvo-pastoral» systems. *Landscape and Urban Planning*, 24: 43–48.

- Pinto-Correia, T., & Azeda, C. (2017). Public policies creating tensions in Montado management models: Insights from farmers' representations. *Land Use Policy*, 64: 76–82.
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., & Potes, J. (2013). Livro Verde dos Montados. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora. Évora. pp. 61.
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., & Sá-Sousa, P. (2011). Introducing the montado, the cork and holm oak agroforestry system of Southern Portugal. *Agroforestry Systems*, 82: 99–104.
- Príncipe, A., Nunes, A., Pinho, P., do Rosário, L., Correia, O., & Branquinho, C. (2014). Modeling the long-term natural regeneration potential of woodlands in semi-arid regions to guide restoration efforts. *European Journal of Forest Research* 133: 757–767.
- Rabhi, F., Narváez-Rivas, M., Tlili, N., Boukhchina, S., & León-Camacho, M. (2016). Sterol, aliphatic alcohol and tocopherol contents of *Quercus ilex* and *Quercus suber* from different regions. *Industrial Crops and Products*, 83, 781-786.
- Rakić, S., Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., & Šiler-Marinković, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104(2), 830-834.
- Rakić, S., Povrenović, D., Tešević, V., Simić, M., & Maletić, R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 416-423.
- Ramos S. (2002). Biología reproductiva de una masa de alcornoque (*Q. Suber* L.) en el sur de Badajoz. Tese de Doutoramento. Universidad De Extremadura, Badajoz.
- Reynolds, J. F., Stafford Smith, D. M., Lambin, E. F., Turner, B. L., Mortimore, M., Batterbury, S. P. J., Downing, T. E., Dowlatabadi, H., Fernández, R. J., Herrick, J. E., Huber-Sannwald, E., Jiang, H., Leemans, R., Lynam, T., Maestre, F.T., Ayarza, M., & Walker, B. (2007). Ecology: Global desertification: Building a science for dryland development. *Science* 316: 847–851.
- Rivas-Martínez, S., Penas, A., & Díaz, T. E. (2004). Bioclimatic map of Europe. *Thermoclimatic belts*, University of León, Spain.
- Rodríguez-Estévez V., García A., Gómez A. G. (2009). Characteristics of the acorns selected by free range Iberian pigs during the montanera season. *Livest Sci*, 122:169–176. doi: 10.1016/j.livsci.2008.08.010.
- Rodriguez-Estévez V., Martínez A. G., Moreno C. M., *et al.* (2008). Dimensiones y características nutritivas de las bellotas de los *Quercus* de la dehesa. *Archivos de zootecnia*, 57,1-12.

Rodríguez-Estévez, V., García, A., Perea, J., Mata, C., & Gómez, A. G. (2007). Producción de bellota en la dehesa: factores influyentes. *Archivos de zootecnia*, 56, 25-43.

Rtibi, K., Hammami, I., Selmi, S., Grami, D., Sebai, H., Amri, M., & Marzouki, L. (2017). Phytochemical properties and pharmacological effects of *Quercus ilex* L. aqueous extract on gastrointestinal physiological parameters in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 787-793.

Safriel, U.N. (2009). Status of desertification in the Mediterranean region. In Water scarcity, land degradation and desertification in the Mediterranean region (pp. 33-73). Springer, Dordrecht.

Sálková, T. et al. (2011). Acorns as a food resource. An experiment with acorn preparation and taste. *Interdisciplinaria Archeologica*, 11:139-147.

Sá-Sousa, P. (2014). The Portuguese montado: Conciliating ecological values with human demands within a dynamic agroforestry system. *Annals of Forest Science*, 71: 1-3.

Sebastiana M., J. Martins, A. Figueiredo, F. Monteiro, J. Sardans, J. Peñuelas, A. Silva, P. Roepstorff, M. S. Pais, A.V. Coelho (2016) *Mycorrhiza*, 27: 109-128.

Silva, S., Costa, E. M., Borges, A., Carvalho, A. P., Monteiro, M. J., & Pintado, M. M. E. (2016). Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 584-588.

Sottomayor, M. (2015). Potencial económico da bolota em Portugal: Análise Exploratória. Symp ABOLOTA o futuro de um alimento com passado. Herdade do Freixo do Meio. 20 Mar., Montemor-o-Novo.

Surová, D. & Pinto-correia, T. (2008). Landscape preferences in the cork oak Montado region of Alentejo, southern Portugal : Searching for valuable landscape characteristics for different user groups Landscape Preferences in the Cork Oak Montado Region of Alentejo, Southern Portugal. *Landscape Research*, 33: 311–330.

Tejerina D., García-Torres S., Cabeza de Vaca M., et al. (2011) Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and interannual variations. *Food Chem*, 124:997–1004. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.058.

Vázquez, F. M., (1998). Producción de bellota en *Quercus* II. Aportación al conocimiento de sus plagas en el sur de la península ibérica. *Solo cerdo ibérico*, 1, 67-75.

Vinha, A. F., Barreira, J. C., Costa, A. S., & Oliveira, M. B. P. (2016). A new age for *Quercus* spp. fruits: Review on nutritional and phytochemical composition and related biological activities of acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 947-981.

Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4(4), 681-695.

White, R. P., & Nackoney, J. (2003). Drylands, people, and ecosystem goods and services: a web-based geospatial analysis (PDF). *World Resources Institute* ([Disponível em: <http://pdf.wri.org/drylands.pdf> acedido em 30/01/2020]).

Yamamori, A., Takata, Y., Fukushi, E., Kawabata, J., Okada, H., Kawazoe, N., ... & Shiomi, N. (2016). Structural analysis of novel low-digestible sucrose isomers synthesized from D-glucose and D-fructose by thermal treatment. *Journal of Applied Glycoscience*, 64:15–19.

Apêndice I - Tabela Suplementar

Tabela S1.1 - Coeficiente de correlação de *Spearman* entre a PMA (azul) e as variáveis biométricas (A-Altura, DAP-Diâmetro à altura do peito, COPA, n=30) (verde), variáveis morfométricas (PF-Peso Fresco, COMP-Comprimento, DIAM-Diâmetro, VOL-Volume, RF-Rácio Forma, n=15) (amarelo) e variáveis bioquímicas (CH-Conteúdo hídrico, GLU-D-glucose, FRU-D-frutose, SAC-sacarose, SAS-Soma dos Hidratos de Carbono Solúveis, RAS-Razão entre os Hidratos de carbono Solúveis, AMIDO, SHC-Soma dos Hidratos de Carbono Não Estruturais, n=8) (vermelho). A negrito estão os valores com significância relevantes para o estudo em causa. Níveis de significância representadas por: “*” $P \leq 0.05$, “**” $P \leq 0.01$, “***” $P \leq 0.001$.

	PMA	A	DAP	COPA	PF	COMP	DIAM	VOL	RF	CH	GLU	FRU	SAC	SAS	RAS	AMID O	SHC
PMA																	
A	0.21																
DAP	0.12	0.15															
COPA	0.26	0.58***	0.31														
PF	0.35	0.16	0.03	0.07													
COMP	-0.21	0.20	-0.06	0.23	0.33												
DIAM	0.35	0.09	-0.03	-0.07	0.78***	0.10											
VOL	0.12	0.13	0.05	0.00	0.81***	0.56**	0.83***										
RF	-0.42*	0.16	-0.04	0.33	-0.31	0.69***	-0.60***	-0.15									
CH	-0.61***	-0.02	-0.02	-0.07	-0.23	0.06	-0.37*	-0.22	0.29								
GLU	-0.75***	-0.28	-0.16	-0.25	-0.08	0.12	0.04	0.14	0.11	0.34							
FRU	-0.72***	-0.27	-0.18	-0.23	-0.09	0.10	0.03	0.11	0.11	0.32	0.93***						
SAC	-0.08	0.23	0.12	0.27	0.13	0.44*	0.29	0.44*	0.17	-0.09	0.15	0.09					
SAS	-0.63***	-0.11	0.02	-0.02	-0.11	0.28	0.08	0.24	0.21	0.22	0.81***	0.76***	0.66***				
RAS	-0.46*	-0.42*	-0.19	-0.40*	-0.07	-0.20	-0.09	-0.14	-0.11	0.24	0.59***	0.62***	-0.62***	0.08			
AMID O	-0.83***	-0.01	-0.12	-0.08	-0.23	0.34	-0.20	0.03	0.44*	0.54**	0.67***	0.60***	0.23	0.61***	0.32		
SHC	-0.82***	-0.09	-0.13	-0.12	-0.21	0.32	-0.06	0.13	0.34	0.42*	0.78***	0.71***	0.46*	0.83***	0.22	0.91***	
RHC	0.32	-0.02	0.19	0.20	0.23	0.00	0.35	0.27	-0.21	-0.38*	0.15	0.18	0.50**	0.41*	-0.28	-0.41*	-0.12

Apêndice II - Provas de degustação com bebidas de bolota

Para avaliar a percepção de doçura dos consumidores das amostras estudadas, foram selecionadas três amostras de dois pontos de recolha com precipitações médias anuais diferentes (Moura, 529 mm e Herdade do Freixo do Meio, 677,50 mm) e foram realizadas três sessões de provas de degustação com 30 inquiridos cada.

1. Preparação das bebidas de bolota

Em primeiro lugar, retirou-se o pericarpo (casca) e a cutícula às bolotas. De seguida, o endosperma foi triturado com água numa proporção de 1:3, peso (g) / volume (mL), numa liquidificadora comum, até se obter uma suspensão aparentemente homogênea. Posteriormente, procedeu-se à coação da suspensão por três vezes (Figura S2.1) de forma a obter um filtrado homogêneo isento de vestígios de endosperma de bolota de tamanho superiores à malha do filtro ($< 1 \text{ mm}^2$).

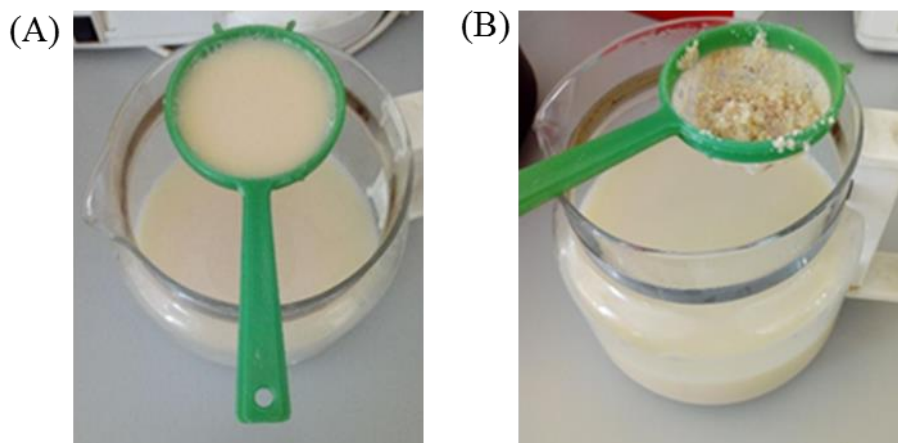


Figura S2.1 - Filtração da suspensão aquosa, bebida, de bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. (A) Filtração da bebida pela primeira vez; (B) Sedimento obtido após as três filtrações realizadas na preparação de cada bebida.

O conteúdo total da bebida em sólidos solúveis (TSS, do acrónimo em inglês *total soluble solids*) foi determinado pelo grau Brix ($^{\circ}\text{Brix}$) usando um refratómetro (Atago, Pallette). Neste caso, como acontece em todos os frutos, o conteúdo em TSS é maioritariamente constituído por açúcares solúveis (como a sacarose, glucose, frutose, mas não o amido), embora outras substâncias solúveis possam também contribuir para o $^{\circ}\text{Brix}$. O valor de $^{\circ}\text{Brix}$ expressa a percentagem de TSS existente na amostra, em g de TSS/ 100 g. No caso de uma solução ou suspensão aquosa, como é o caso das bebidas de bolota, o $^{\circ}\text{Brix}$ é expresso em g de TSS/ 100 mL.

2. Provas de degustação das bebidas de bolota

Através do questionário simples apresentado na Figura S2.2, foi solicitado aos inquiridos que seleccionassem uma das opções de resposta face à sua intenção de voltar a beber a respetiva bebida (Jayasena e Cameron, 2007), para que fosse calculada a % de aceitação como mostra a Equação S1.

Código da bebida: _____

1 Nem pensar em voltar a beber isto!!! ☐

2 Não gostei... mas daria uma 2ª oportunidade. ☐

3 Bebe-se bem... ☐

4 Gostei bastante!!!! ☐

Figura S2.2 - Inquérito apresentados aos provadores das bebidas de bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*.

$$\text{Equação S1: \% aceitação} = \frac{N^{\circ} \text{ inquiridos que avaliou a bebida em } > 2}{N^{\circ} \text{ inquiridos total prova}} \times 100$$

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela S2.1, evidenciam a aceitação positiva das bebidas aquosas preparadas com bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* que variou entre 57% e 80%. A aceitação foi mais elevada quando as bolotas eram provenientes de Moura (M1-M3), onde o °Brix variou de 5,7 a 6,7 %, do que quando provinham da Herdade do Freixo do Meio (F1-F3) cujos valores de °Brix variaram entre 5,5 a 5,7 %. A aceitação da bebida sugere uma dependência do teor em açúcares solúveis, mas que terá de ser confirmada com uma maior amostragem.

Tabela S2.1 - Aceitação das bebidas de bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* e respetivo teor em açúcares solúveis (°Brix). M – Bolotas recolhidas em Moura; F – Bolotas recolhidas na Herdade do Freixo do Meio; 1, 2 e 3 referem-se a sessões distintas de provas.

ID amostra	°Brix (%)	Aceitação (%)	Pontuação
M1	6,5	80	91
M2	6,7	70	83
M3	5,7	63	79
F1	5,7	70	88
F2	5,5	57	80
F3	5,6	63	81

Na avaliação da aceitação das bebidas de bolota, em que cada provador experimentou uma bebida de cada um dos locais, foi ainda solicitado que respondessem à pergunta: *Qual das bebidas achou mais doce?*

As respostas obtidas (Tabela S2.2) mostram que a percepção de doçura por parte dos consumidores acompanha o teor em açúcares solúveis determinado pelo °Brix (Tabela S2.1), sendo, assim, maior nas bebidas produzidas com bolotas de Moura (maior °Brix). Também o conteúdo em fenóis, relacionado com o seu amargor, tende a ser menor em bolotas provenientes de Moura, pelo que não é de excluir a interação destes dois componentes no grau de aceitação das bolotas para consumo humano na forma de bebidas ou em outras formas.

Tabela S2.2 - Percepção de doçura das bebidas de bolotas de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*.

Qual achou mais doce?	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3
Não conseguiu decidir-se por uma	4	5	2
Moura	15	14	15
Herdade do Freixo do Meio	12	11	13

A abordagem seguida neste estudo preliminar, indica que bebidas aquosas muito simples de bolota de azinheira podem ter elevada aceitação por parte dos consumidores e que o nível de aceitação depende do teor em açúcares solúveis. Também o conteúdo em fenóis, relacionado com o seu amargor, tende a variar inversamente com o conteúdo em hidratos de carbono solúveis, pelo que não é de excluir a interação destes dois componentes no grau de aceitação das bolotas para consumo humano, na forma de bebidas ou em outras formas.